



HAL
open science

Extraction-Purification-Formulation de composés naturels capables de bloquer la synthèse de l'Aflatoxine B1

Christopher Hernandez Hernandez

► **To cite this version:**

Christopher Hernandez Hernandez. Extraction-Purification-Formulation de composés naturels capables de bloquer la synthèse de l'Aflatoxine B1. Sciences agricoles. Institut National Polytechnique de Toulouse - INPT, 2021. Français. NNT : 2021INPT0114 . tel-04186717

HAL Id: tel-04186717

<https://theses.hal.science/tel-04186717>

Submitted on 24 Aug 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (Toulouse INP)

Discipline ou spécialité :

Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Présentée et soutenue par :

M. CHRISTOPHER HERNANDEZ HERNANDEZ

le lundi 6 décembre 2021

Titre :

Extraction-Purification-Formulation de composés naturels capables de bloquer la synthèse de l'Aflatoxine B1

Ecole doctorale :

Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingénieries (SEVAB)

Unité de recherche :

Toxicologie Alimentaire (ToxAlim)

Directeurs de Thèse :

M. JEAN-DENIS BAILLY

MME CÉLINE MATHIEU

Rapporteurs :

M. MARCO ANTONIO SALGADO CERVANTES, INSTITUT TECHNOLOGIQUE DE VERACRUZ

MME ANGELIQUE FONTANA, UNIVERSITE DE MONTPELLIER

Membres du jury :

MME FLORENCE MATHIEU, TOULOUSE INP, Présidente

M. CHAKER EL KALAMOUNI, UNIVERSITE DE LA REUNION, Membre

M. JEAN-DENIS BAILLY, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

MME CÉLINE MATHIEU, TOULOUSE INP, Membre

MME VANESSA DURRIEU, TOULOUSE INP, Invitée

*A la personne qui m'a façonné et m'a donné
bien plus que je ne mérite, J'espère te revoir...*

À vous Papa †

Remerciements

En ce moment, je me trouve face à l'aboutissement d'une étape de ma vie qui a été particulièrement formatrice, tant sur le plan professionnel que personnel. En repensant au mois de février 2018 où cette aventure a commencé, je trouve une personne totalement différente de celle qui écrit ces lignes. De nombreuses personnes ont contribué à cette métamorphose, et je tiens à les remercier par ces mots, même s'ils sont insuffisants. Sans ces personnes, cette thèse n'aurait pas été possible et décidément, je ne serais pas là.

Tout d'abord, je tiens à remercier le CONACY et le gouvernement français, qui m'ont accordé une bourse pour pouvoir développer cette thèse, sans laquelle il n'aurait pas été possible de commencer cette aventure dans ce merveilleux pays.

De même, je tiens à remercier Mme Isabelle OSWALD, directrice de l'UMR1331 Toxalim, INRAE, M. Pierre SANS, directeur de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse et Mme Sophie THIEBAUD-ROUX, directrice du Laboratoire de Chimie Agro-industrielle, qui m'ont accueilli dans leurs groupes de travail respectifs et m'ont permis de développer mes travaux de recherche.

J'adresse mes remerciements aux rapporteurs Mme Angélique Fontana et M. Marco Antonio Salgado Cervantes et aux membres du jury Mme Florence Mathieu et M. Chaker El Kalamouni, pour vos précieux commentaires et la discussion très intéressante.

Je souhaite vivement remercier mes trois directeurs de thèse. Un grand merci à M. Jean-Denis Bailly pour ses commentaires et conseils toujours avisés. Merci de m'avoir fait confiance dès le premier jour, même si lors de notre première rencontre je n'en ai pas compris la majeure partie par manque de maîtrise du français. Merci car j'ai beaucoup appris de vos compétences scientifiques, de votre méthodologie de travail et de votre capacité à analyser les résultats. Merci pour tout le temps que vous avez passé (y compris les week-ends) à réviser et à améliorer la qualité de ce manuscrit. Avant tout, j'apprécie sincèrement votre compréhension et votre soutien face à toutes les situations personnelles compliquées que j'ai eu à vivre durant ces années. Avoir un directeur de thèse comme vous a définitivement rendu cette expérience extrêmement enrichissante. Un grand et particulier merci à Mme Céline Mathieu pour m'avoir apporté son aide dans mon adaptation dans ce pays et cette culture, depuis le début et jusqu'à maintenant. Merci de m'avoir appris un certain nombre de techniques d'analyse et d'avoir partagé vos

connaissances qui m'ont permis d'atteindre le niveau d'analyse des résultats nécessaire pour discuter de ce travail, merci pour ces entretiens personnels qui ont été une échappatoire nécessaire dans les moments difficiles, mais, surtout, merci pour votre amitié. Un grand merci à Mme Vanessa Durrieu pour son soutien inconditionnel. Merci pour ces précieuses notes à chaque réunion, qui nous ont permis d'organiser nos brainstormings récurrents, qui devenaient parfois chaotiques avec l'intention de poursuivre les analyses dans des directions différentes, merci pour la proactivité qui vous caractérise, mais, surtout, merci pour votre soutien sur le plan personnel et votre intérêt pour mon bien-être. Merci en général à eux trois, car s'il est vrai qu'il a parfois été difficile de s'entendre du fait de la multidisciplinarité de ce projet, ils ont toujours été prêts à donner le meilleur d'eux-mêmes pour organiser et homogénéiser les idées, générant au final une belle équipe de travail. Je suis reconnaissant, car je n'aurais pas pu avoir de meilleurs conseillers.

Je tiens à remercier trois personnes qui d'une certaine manière ont permis que les manipulations soient réalisées dans les meilleures conditions. Merci Isaura Cáceres, pour avoir mené les premières études sur la capacité anti-AFB1 des plantes mexicaines, qui ont servi de base à l'élaboration de cette thèse. Merci aussi pour tes conseils, avant même d'arriver en France, pour ces folles aventures que nous nous vivons ensemble depuis le premier jour de notre rencontre (une journée inoubliable hahaha) et surtout merci pour cette amitié qui se renforce avec le temps. Merci à Anwar d'avoir toujours été prêt à supporter les manipulations, d'avoir toujours préparé le matériel pour faciliter le travail et surtout pour ces longues journées d'inoculation et d'extraction. De la même manière, je tiens à remercier Laura Fiorella Cadenillas, pour m'avoir permis de participer à l'encadrement de tes travaux de Master 1 et Master 2, et pour ton aide dans les manipulations qui ont donné lieu à des entretiens très intéressants qui se sont terminés par une belle amitié.

Je tiens à remercier mes amis, sans lesquelles ce parcours n'aurait pas été pareil. Merci à cette grande communauté latino qui était déjà consolidée par plusieurs générations d'étudiants et qui m'a accueilli comme l'un des membres du groupe. Merci Pablo pour tes conseils opportuns et pour m'avoir accordé ton amitié désintéressée. Merci à Monica pour ces jours de fête tant en France qu'au Mexique, ce fut un plaisir de te rencontrer et de profiter de ton amitié. Merci Jésus pour cette personnalité effervescente qui permet de

rompre la monotonie peu importe les circonstances, merci pour tes précieux conseils sur le fonctionnement du laboratoire même si tes manipulations ne permettaient à personne d'autre d'être proche de toi et merci pour ton amitié. Andrés, ton caractère d'être toujours à l'opposé de tout, te permet de voir des choses qui ne seraient pas possibles autrement, merci pour les rires et les discussions. Lilia, merci pour tes conseils sur le quartier et pour ces nuits de longues discussions avec Isaura, elles resteront à jamais gravées dans ma mémoire. À mes camarades de génération, Gabi, merci pour ces discussions et conseils que nous avons partagés, merci Luce pour ton amitié et pour les longues discussions, anecdotes et histoires que nous avons partagées, Ale, merci beaucoup pour ces longues pauses café et dans lesquelles tu m'as permis de rencontrer la grande personne que tu es et cela nous a permis de commencer cette grande amitié. A tous mes amis LGC qui ont toujours été là, merci Lauren, Magno, Marco, Silvia, Rosauero, merci pour tout.

Merci à ces gens merveilleux que j'ai rencontrés dans ce pays et que je peux maintenant appeler des amis. Alex, mon premier ami français, celui qui m'a beaucoup appris sur la culture et ta façon de voir la vie, tu es une excellente personne et ami, Elise, merci beaucoup pour ton amitié et pour ta bonne humeur, Laurent, merci pour tout.

Je dois tout à ma famille, qui a été ma force motrice et qui a toujours été à mes côtés de manière désintéressée....

À mes oncles, Pedro et Silvia, qui tout au long de ma vie ont été mes deuxièmes parents, merci car chaque fois que j'ai eu besoin de quelque chose, peu importe ce que c'était, vous avez été là pour moi, merci pour tout votre soutien.

Mon frère, merci de toujours m'apporter ton soutien, je sais qu'aucun de nous n'est expressif, mais à cause de cette même compatibilité de caractère, nous savons que nous serons toujours là l'un pour l'autre même si nous ne nous parlons pas tous les jours, tu sais combien je t'aime.

Ma mère, tout ce qui est bon en moi est grâce à toi, tu es le pilier sur lequel s'est formé une grande partie de ma personnalité et même si je ne le dis pas souvent, aujourd'hui je veux en profiter pour te remercier pour tous les sacrifices que tu as fait sans hésiter pour moi et pour avoir consacré les meilleures années de ta vie à la formation de mon frère et moi, cette réalisation est aussi la tienne.

Ada, merci d'avoir décidé de faire partie de ma vie, tu es ce complément dont je ne savais pas avoir besoin jusqu'à ce que je te rencontre, j'ai vécu à tes côtés les meilleurs moments de ma vie, ceci inclus, merci pour tout ton soutien, et pour avoir quitté ton pays et ta famille pour que nous soyons ensemble, je t'aime.

Mes enfants, Caleb et Aitana, je sais qu'ils sont encore trop jeunes pour comprendre cela, mais si un jour ils prennent la décision de lire ces lignes, sachez que vous deux avez été le carburant qui m'a permis de continuer ce rêve même quand tout était contre moi et mes propres forces ne suffisaient pas, voir vos beaux visages et vos blagues m'a ramené à la vie.

Enfin, je tiens à remercier mon père, Gabriel Hernandez Lopez, à qui je dédie cette thèse, tu as été le marteau avec lequel ma personne a été forgée. La situation la plus forte et la plus douloureuse à laquelle j'ai dû faire face dans ma vie a été de te perdre, mais c'est grâce à l'entraînement constant que tu m'as donné pendant la tienne que j'ai pu me relever. C'est bien triste que tu n'aies pas pu réaliser un de tes derniers rêves, qui était de me voir terminer mon doctorat, mais le plus triste était de ne pas pouvoir te faire un dernier câlin et te dire je t'aime pour te dire au revoir, mais en l'honneur du grand homme que tu étais et de te dire ce dernier au revoir, je t'aime et c'est pour toi.

Liste des Abréviations

AA	Acide aspergillique
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
ACP	Acide cyclopiazonique
ADF	Fibre au détergent acide
ADN	Acide desoxyribonucléique
AF	Aflatoxines
AF-ALB	Adduits aflatoxine-albumine
AFAR	Aflatoxine aldéhyde réductase
AFB1	Aflatoxine B1
AFB2	Aflatoxine B2
AFBO	l'AFB1-8,9-endo et exo -époxyde
AFG1	Aflatoxine G1
AFG2	Aflatoxine G2
AFM1	Aflatoxine M1
AFM2	Aflatoxine M2
AK	Acide kojique
ALARA	As Low As Reasonably Achievable
ARN	Acide ribonucléique
AT	Acide tenuazonique
a_w	Activité de l'eau
BV	réaction de Baeyer-Villiger
CAT	Catalases
CHC	Carcinome hépatocellulaire
CoA	acétyl coenzyme A
DA	Daltons
DBD	DNA-binding domain
DMT	Dose maximale tolérable
DPPH	2,2-difenil-1-picrylhydrazyl
DTP	Ditryptophénaline
EAG	Equivalent acide gallique
EALG	Extrait aqueux de <i>Lippia graveolens</i>
EALT	Extrait aqueux de <i>Larrea tridentata</i>
EAM	Extrait aqueux de <i>Mimosa tenuiflora</i>
EFSA	Agence européenne de sécurité des aliments
F1LT	Fraction 1 de <i>Larrea tridentata</i>
F2LT	Fraction 2 de <i>Larrea tridentata</i>
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations

FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
GPX	Glutathion peroxydase
GRAS	Generally Recognized as Safe
GST	Glutathion-s-transférase
HE	Huiles essentielles
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
HPLC-MS	Chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à la spectrométrie de masse
IARC	International Agency for Research on Cancer
Kb	kilobytes
MEA	Malt Extract Agar
MM	Matière Minérale
MS	Masse Sèche
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleotido fosfato
NDF	Fibre au détergent neutre
NDGA	Acide nordihydroguaiarétique
OMST	O-méthylsterigmatocystine
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
ppb	Particules par billion
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidone
q-PCR	Real-time polymerase chain reaction
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SOD	Superoxyde dismutase
ST	Stérigmatocystine
TF	Facteurs de transcription
TR	Terréine
UE	Union européenne
UHT	Ultra pasteurisation
UPLS	Ultra Performance Liquid Chromatography
USDA-ARS	Service de recherche agricole du ministère de l'Agriculture des États-Unis
USEPA	l'Agence américaine de protection de l'environnement
UV	Ultra-violet
VCG	Groupes de compatibilité végétative
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WHO	World Health Organization

PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Articles

-*Mimosa tenuiflora* Aqueous Extract: Role of Condensed Tannins in Anti-Aflatoxin B1 Activity in *Aspergillus flavus*

Christopher Hernandez, Laura Cadenillas, Anwar El Maghubi, Isaura Caceres, Vanessa Durrieu, Céline Mathieu, Jean-Denis Bailly.

Publié dans *Toxins*, 13(6), 391. DOI : 10.3390/toxins13060391

-Preservation of *Mimosa tenuiflora* Antiaflatoxigenic Activity Using Microencapsulation by Spray Drying

Christopher Hernandez, Laura Cadenillas, Céline Mathieu, Jean-Denis Bailly, Vanessa Durrieu.

Publié dans *Molecules*, 27(2), 496. DOI : 10.3390/molecules27020496

Conférences

Congrès internationaux

-*Mimosa tenuiflora* extract inhibits aflatoxin B1 synthesis

Christopher Hernandez, I. Caceres, O. Puel, V. Durrieu, J.D. Bailly, C. Mathieu.

15th International Conference on Renewable Resources and Biorefineries, Toulouse, France (June, 2019). *Présentation orale*

-Effect of *Mimosa tenuiflora* Aqueous Extract on Aflatoxin B1 Production in *Aspergillus flavus*: role of condensed tannins

Christopher Hernández, Laura Cadenillas, Anwar El Maghubi, Isaura Caceres, Vanessa Durrieu, Céline Mathieu, Jean-Denis Bailly.

42nd Mycotoxin Workshop, Muenster, Germany (June, 2021). *Présentation orale*

Congrès nationaux

-Inhibition de la synthèse d'aflatoxine B1 par un extrait de *Mimosa tenuiflora*

Christopher Hernandez, Isaura Caceres, Olivier Puel, Vanessa Durrieu, Jean Denis Bailly, Céline Mathieu.

2ème Rencontres Francophones sur les Légumineuses (RFL), Toulouse, France (Octobre, 2018). *Poster*

INTRODUCTION	1
PARTIE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	2
I.1 L'Aflatoxine B1	3
I.1.1 Généralités	3
I.1.2 Caractéristiques biochimiques	3
I.1.3 Toxicité	5
I.1.3.1 Voies de métabolisation et mécanisme d'action de l'AFB1	5
I.1.3.2 Toxicité aiguë	8
I.1.3.3 Toxicité chronique	9
I.1.3.3.1 Effet immunosuppresseur	10
I.1.3.3.2 Effet tératogène	10
I.1.3.3.3 Effets mutagènes et cancérogénicité	11
I.1.4 Règlementation	12
I.2 Biosynthèse de l'AFB1	17
I.2.1 Espèces productrices	17
I.2.2 Conditions de développement et de toxinogénèse	20
I.2.2.1 Paramètres environnementaux	20
I.2.2.2 Aliments contaminés	21
I.2.3 Voie de biosynthèse et régulation de l'AFB1	26
I.2.3.1 Le cluster de gènes de la voie de biosynthèse	26
I.2.3.2 Cascade enzymatique conduisant à la synthèse des aflatoxines	26
I.2.3.3 Régulation	29
I.2.3.3.1 Gènes régulateurs internes <i>aflR</i> et <i>aflS</i>	29
I.2.3.3.2 Régulateurs externes : rôle majeur du stress oxydatif	30
I.3 Moyens de lutte contre les aflatoxines	33
I.3.1 Niveau d'intervention	33
I.3.2 Méthodes conventionnelles de lutte contre la contamination par les aflatoxines	34
I.3.2.1 Bonnes pratiques agricoles	34
I.3.2.1.1 Au champ	34
I.3.2.1.2 Période péri-récolte	35
I.3.2.1.3 Stockage	36
I.3.2.2 Produits phytosanitaires	37
I.3.2.2.1 Les fongicides	37
I.3.2.2.2 Les insecticides	39
I.3.3 Méthodes alternatives	41
I.3.3.1 Stratégies de bio-contrôle	41
I.3.3.1.1 Utilisation de souches atoxinogènes	41

I.3.3.1.2	Utilisation de bactéries	43
I.3.3.2	Utilisation de composés naturels	46
I.3.3.2.1	Extraits de plantes	47
I.3.3.2.2	Huiles essentielles	50
I.3.3.2.3	Molécules isolées	53
PARTIE II : TRAVAIL DE THESE		53
II.1	Choix des plantes	54
II.1.1	Introduction	54
II.1.2	Description botanique des plantes choisies	55
II.1.2.1	<i>Mimosa tenuiflora</i>	57
II.1.2.2	<i>Larrea Tridentata</i>	58
II.1.2.3	<i>Lippia Graveolens</i>	59
II.1.3	Composition chimiques des plantes	59
II.1.3.1	<i>Mimosa tenuiflora</i>	59
II.1.3.1.1	Composés phénoliques	59
II.1.3.1.2	Autres molécules actives	61
II.1.3.2	<i>Larrea tridentata</i>	62
II.1.3.2.1	Composés phénoliques	63
II.1.3.2.2	Autres molécules actives	64
II.1.3.3	<i>Lippia graveolens</i>	64
II.1.3.3.1	Composés phénoliques	64
II.1.3.3.2	Autres molécules actives	65
II.1.4	Activités biologiques associées	66
II.1.4.1	Activités antiradicalaires	66
II.1.4.1.1	<i>Mimosa tenuiflora</i>	66
II.1.4.1.2	<i>Larrea tridentata</i>	67
II.1.4.1.3	<i>Lippia graveolens</i>	67
II.1.4.2	Activités antimicrobiennes	68
II.1.4.3	Autres activités biologiques	70
II.1.4.3.1	<i>Mimosa tenuiflora</i>	70
II.1.4.3.2	<i>Larrea tridentata</i>	71
II.1.5	Conclusion	72
II.2	Extraction et caractérisation des extraits végétaux	73
II.2.1	Introduction	73
II.2.1.1	Les méthodes d'extraction	73
II.2.1.2	Extraction des composés phénoliques	78
II.2.2	Composition et caractérisation globale de la matière première végétale utilisée	79

II.2.2.1	Teneur en fibres de <i>Mimosa tenuiflora</i> , <i>Larrea tridentata</i> et <i>Lippia graveolens</i>	81
II.2.3	Extractions et caractérisation des extraits de plantes	83
II.2.4	Activités biologiques des extraits	86
II.2.5	Conclusion	90
II.3	Étude des activités biologiques de l'écorce de <i>M. tenuiflora</i> en relation avec sa composition chimique	91
II.3.1	Introduction	91
II.3.2	<i>Mimosa tenuiflora</i> Aqueous Extract: Role of Condensed Tannins in Anti-Aflatoxin B1 Activity in <i>Aspergillus flavus</i> (<i>Toxins</i> , 2021, 13, 391).	93
II.3.3	Etudes complémentaires de la composition du <i>Mimosa tenuiflora</i>	110
II.3.3.1	Extractions avec une gamme de solvants	110
II.3.3.2	Profil HPLC-MS de l'extrait aqueux	111
II.3.3.3	Profil HPLC-MS de l'extrait méthanolique	112
II.3.4	Conclusion	114
II.4	Etude du fractionnement des extraits aqueux de <i>Larrea tridentata</i> et <i>Lippia graveolens</i>	116
II.4.1	Introduction	116
II.4.2	Fractionnement sur colonne	116
II.4.2.1	Fractionnement de <i>Larrea tridentata</i>	117
II.4.2.2	Fractionnement de <i>Lippia graveolens</i>	121
II.4.3	Comparaison des trois extraits aqueux et de leurs fractions respectives	125
II.5	Etude de l'effet de différents matériaux enrobant sur la microencapsulation par Spray Drying de l'extrait aqueux de l'écorce de <i>Mimosa tenuiflora</i>	130
II.5.1	Introduction	130
II.5.2	Preservation of <i>Mimosa tenuiflora</i> Antiaflatoxic Activity Using Microencapsulation by Spray Drying (<i>Molecules</i> , 2022 27(2), 496).	132
II.5.3	Conclusion	145
PARTIE III. MATERIEL ET METHODES		147
III.1	Matériel	148
III.1.1	Plantes	148
III.1.2	Réactifs, matériaux enrobant	149
III.2	Méthodes	149
III.2.1	Conditionnement et caractérisation de la matière première et des extraits	149
III.2.1.1	Broyage de la matière première	149
III.2.1.2	Détermination de la matière sèche des solides (matières premières) et de liquides (extraits et fractions)	149
III.2.1.3	Détermination de la matière minérale	150

III.2.1.4	Détermination de la teneur fibres	150
III.2.1.5	Dosage des protéines	153
III.2.2	Fractionnement	155
III.2.2.1	Extraction aqueuse à l'échelle laboratoire	155
III.2.2.2	Extraction aqueuse à l'échelle pilote	155
III.2.2.3	Extractions Soxhlet	155
III.2.2.4	Fractionnement sur résine Amberlite	156
III.2.2.5	Fractionnement PVPP	156
III.2.3	Caractérisations des extraits	157
III.2.3.1	Détermination des polyphénols totaux	157
III.2.3.2	Détermination de la teneur en tanins condensés	158
III.2.3.3	Détermination de l'activité antioxydante	159
III.2.3.4	Tests sur <i>Aspergillus flavus</i>	160
III.2.3.4.1	Souche fongique et conditions de culture	160
III.2.3.4.2	Extraction et quantification de l'aflatoxine B1 par HPLC	161
III.2.4	Encapsulation	162
CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		164
RÉFÉRENCES		169

Liste des Figures

Figure 1. Structures des principales aflatoxines.	4
Figure 2. Différentes voies de métabolisation de l'AFB1.	7
Figure 3. Photographie d'une colonie d' <i>Aspergillus flavus</i> sur Malt Extract Agar (MEA) après 5 jours de culture à 27°C.	19
Figure 4. Organisation des 30 gènes du cluster responsable de la biosynthèse des aflatoxines chez <i>A. flavus</i> .	26
Figure 5. Cascade enzymatique conduisant à la synthèse de l'AFB1 et niveau d'intervention des gènes du cluster codant pour les enzymes impliquées	28
Figure 6. Réactions catalysées par des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) pour détoxifier les ROS	31
Figure 7. Schéma représentant la réponse globale de <i>A. flavus</i> au stress oxydatif et le lien possible avec la production d'aflatoxines.	32
Figure 8. Arbre de <i>M. tenuiflora</i>	57
Figure 9. Arbuste de <i>Larrea tridentata</i>	58
Figure 10. Arbuste de <i>Lippia graveolens</i>	59
Figure 11. Phénoxychromones isolées de l'écorce de <i>Mimosa tenuiflora</i>	60
Figure 12. Chalcones isolées de l'écorce de <i>Mimosa tenuiflora</i>	60
Figure 13. a) N, N-diméthyltryptamine (DMT) b) Yuremamine	61
Figure 14. Saponines triterpénoïdes isolées de l'écorce de <i>Mimosa tenuiflora</i>	62
Figure 15. NDGA (1) et Mal. 4 (2) identifiés dans <i>L. tridentata</i>	64
Figure 16. Principaux composés de <i>Lippia graveolens</i> .	65
Figure 17. Schéma des trois étapes élémentaires de l'extraction solide/liquide par un solvant dans un solide végétal	75
Figure 18. Schéma de processus d'extraction Soxhlet.	77
Figure 19. Effet de différentes concentrations des extraits aqueux de <i>Mimosa tenuiflora</i> (a), <i>Larrea tridentata</i> (b) et <i>Lippia graveolens</i> (c) sur la production d'AFB1 et la croissance fongique dans la souche <i>A. flavus</i> NRRL 62477.	89
Figure 20. Chromatogramme de l'extrait brut de <i>M. tenuiflora</i> obtenu par HPLC-MS sur une colonne F5 et avec une détection masse en mode positif.	111

Figure 21. Schéma du fractionnement de l'extrait aqueux de <i>Larrea tridentata</i> sur résine Amberlite FPX66.	117
Figure 22. Aspects de la fraction 1 et de la fraction 2 de <i>Larrea tridentata</i> .	119
Figure 23. Production d'AFB1 et croissance fongique des fractions obtenues après fractionnement de l'extrait aqueux de <i>Larrea tridentata</i> sur <i>A. flavus</i> , a) fraction 1, b) fraction 2.	120
Figure 24. Schéma du fractionnement de l'extrait aqueux de de <i>Lippia graveolens</i> sur résine Amberlite FPX66.	122
Figure 25. Aspects de la fraction 1 et de la fraction 2 de <i>Lippia graveolens</i> .	123
Figure 26. Production d'AFB1 et croissance fongique après exposition d' <i>A. flavus</i> à des concentrations croissantes des deux fractions obtenues après fractionnement de l'extrait aqueux de <i>Lippia graveolens</i> a) fraction 1, b) fraction 2.	124
Figure 27. Relation entre l'activité antioxydante et activité anti-aflatoxinogène des extraits et fractions testés.	128
Figure 28. Aspect visuel des matières premières : a) <i>Mimosa tenuiflora</i> , b) <i>Larrea Tridentata</i> , c) <i>Lippia graveolens</i>	148
Figure 29. Schéma de la procédure des attaques chimiques effectuées sur la matière première par la méthode ADF-NDF.	151

Liste des Tableaux

Tableau 1. Propriétés physiques et chimiques des principales aflatoxines _____	5
Tableau 2. DL50 de l'aflatoxine B1 dans différentes espèces animales (Dharumadurai et al. 2011)._____	8
Tableau 3. Teneurs maximales tolérées en mycotoxines dans les denrées alimentaires, les produits laitiers et les aliments pour animaux (FAO 2004). _____	12
Tableau 4. Espèces productrices d'aflatoxines appartenant aux sections <i>Flavi</i> , <i>Ochraceorosei</i> et <i>Nidulantes</i> , adapté de Varga et al., (2015) et Frisvad et al., (2019). ____	17
Tableau 5. Contamination par les aflatoxines de différents produits alimentaires dans le monde. _____	22
Tableau 6. Stratégies possibles pour lutter contre la contamination par les aflatoxines (modifié à partir de (Sipos et al. 2021)) _____	33
Tableau 7. Principaux insecticides et mécanisme d'action (Sanchez-Bayo 2014) _____	39
Tableau 8. Effet inhibiteur de quelques huiles essentielles sur la croissance d' <i>A. flavus</i> et la production d'AFB1 _____	51
Tableau 9. Effet inhibiteur de quelques extraits de plantes sur la croissance d' <i>A. flavus</i> et la production d'AFB1 _____	48
Tableau 10. Effet inhibiteur de différentes molécules issues de plantes sur la croissance d' <i>A. flavus</i> et la production d'AFB1 _____	54
Tableau 11. Informations générales sur <i>M. tenuiflora</i> , <i>L. tridentata</i> et <i>L. graveolens</i> ____	56
Tableau 12. Principaux constituants de <i>Larrea tridentata</i> (Brinker 1993). _____	62
Tableau 13. Effet inhibiteur de <i>M. tenuiflora</i> , <i>L. tridentata</i> et <i>L. graveolens</i> sur différents microorganismes _____	68
Tableau 14. Principaux groupes de composés phénoliques dissous par les solvants d'extraction les plus utilisés _____	78
Tableau 15. Teneurs en matières sèches, matière minérale, azote organique, et protéines de <i>Mimosa tenuiflora</i> , <i>Larrea tridentata</i> et <i>Lippia graveolens</i> _____	80
Tableau 16. Teneurs en fibres de <i>Mimosa tenuiflora</i> , <i>Larrea tridentata</i> et <i>Lippia graveolens</i> _____	81
Tableau 17. Conditions d'extraction utilisées pour l'extraction par macération à l'échelle du laboratoire et pilote des trois plantes de l'étude. _____	83

Tableau 18. Masse sèche, rendement d'extraction et teneur en polyphénols totaux des extraits à l'échelle laboratoire et pilote de <i>Mimosa tenuiflora</i> , <i>Larrea tridentata</i> et <i>Lippia graveolens</i> .	83
Tableau 19. Activité antiradicalaire et antiaflatoxigène des extraits aqueux de <i>Mimosa tenuiflora</i> , <i>Larrea tridentata</i> et <i>Lippia graveolens</i>	87
Tableau 20. Indice de polarité et constante diélectrique des solvants utilisés – d'après (Snyder 1968).	110
Tableau 21. Rendement d'extraction et masse sèche des extraits obtenus par la méthode soxhlet avec différents solvants à partir de l'écorce de <i>M. tenuiflora</i> .	110
Tableau 22. Masses relevées par HPLC-MS ESI+ dans l'extrait aqueux de <i>M. tenuiflora</i> .	111
Tableau 23. Composés identifiés par HPLC-MS dans l'extrait méthanolique de <i>M. tenuiflora</i> .	112
Tableau 24. Spectres de masse de la N, N-diméthyléthyltryptamine (DMT) et de la Yuremamine identifiés par HPLC-MS dans l'extrait méthanolique de <i>M. tenuiflora</i> (ESI mode positif).	113
Tableau 25. Rendement de l'étape de fractionnement, teneur en polyphénols totaux, activité antiradicalaire et activité anti-aflatoxinogène des extraits aqueux et des fractions de <i>Mimosa tenuiflora</i> , <i>Larrea tridentata</i> et <i>Lippia graveolens</i> .	126
Tableau 26. Matières premières utilisées.	148

INTRODUCTION

La contamination des récoltes par les aflatoxines (métabolites secondaires fongiques cancérigènes pour l'homme) est un problème de santé publique majeur, en particulier dans les régions chaudes où les conditions sont favorables pour le développement des espèces fongiques productrices (*A. flavus* et *A. parasiticus*). Cependant, les changements climatiques en cours modifient la distribution de ces toxines et leur présence a été signalée en Europe et notamment en France.

Pour limiter l'exposition des consommateurs à ces contaminants, il existe des réglementations dans de nombreux pays dont l'Europe. Ces limites visent à protéger les consommateurs mais ont aussi des impacts économiques forts en limitant la valeur des lots contaminés.

Afin de limiter la contamination des récoltes par les aflatoxines, différentes stratégies ont été développées. Elles visent à prévenir la contamination, décontaminer les aliments ou limiter les effets toxiques des contaminants présents (détoxification).

Nos travaux visent à améliorer la lutte contre la contamination en prévenant la biosynthèse de la toxine par les espèces fongiques présentes dans les récoltes par l'utilisation d'extraits naturels de plantes, source de composés bioactifs et principalement de composés phénoliques à activité antioxydante.

Dans ce contexte, nous avons, dans un premier temps, évalué la capacité des extraits aqueux de trois plantes mexicaines (*Mimosa tenuiflora*, *Larrea tridentata* et *Lippia graveolens*) à inhiber la production d'aflatoxine B1 par *A. flavus*.

Ces extraits ont ensuite été caractérisés pour leur teneur en composés phénoliques et leur capacité antioxydante. Ils ont ensuite été fractionnés pour caractériser les molécules/propriétés biologiques responsables de l'inhibition de la production d'AFB1. Ces essais montrent qu'il existe une relation entre la teneur en composés phénoliques et la capacité antioxydante des extraits et leur capacité à inhiber la production d'AFB1.

Partie I : Données bibliographiques

I.1 L'Aflatoxine B1

I.1.1 Généralités

Le terme Aflatoxine regroupe toute une famille de composés. Cependant, il est courant de l'utiliser pour se référer uniquement à l'AFB1, car c'est la molécule la plus fréquemment retrouvée dans les aliments, mais c'est aussi la plus dangereuse de toute cette famille.

Les aflatoxines (AF) sont un groupe de composés hétérocycliques de faible poids moléculaire produits comme métabolites secondaires par certains champignons filamenteux, principalement des espèces appartenant au genre *Aspergillus* et plus spécifiquement à la section *Flavi*. *A. flavus* et *A. parasiticus* sont les espèces les plus fréquentes dans les aliments (Medina et al., 2014).

La découverte des AF date des années 60 à la suite d'une intoxication animale aiguë apparue en Angleterre dans les années 60 et appelée "Turkey X disease". La toxine isolée du champignon contaminant les aliments distribués aux dindons a été nommée aflatoxine. Le nom est un acronyme formé en combinant la lettre "A" pour *Aspergillus*, "FLA" pour *flavus* et toxine signifiant poison (Rustom, 1997).

I.1.2 Caractéristiques biochimiques

Les aflatoxines forment une famille de plusieurs molécules (environ 20), dont seulement quatre sont produites par des champignons et peuvent être fréquemment trouvées dans les aliments contaminés : Aflatoxine B1 (AFB1), Aflatoxine B2 (AFB2), Aflatoxine G1 (AFG1) et Aflatoxine G2 (AFG2) (figure 1) (Ashiq et al., 2014). Les autres composés correspondent à des métabolites apparaissant dans l'organisme après métabolisation des toxines fongiques.

C'est le cas de l'aflatoxine M1 (AFM1), qui est un produit hydroxylé de la bioconversion, chez les mammifères, de l'AFB1, et qui est excrétée dans le lait des animaux qui consomment des aliments contaminés par cette aflatoxine (Boudra et al., 2007). La lettre M vient de Milk (lait en anglais).

Les abréviations de ces toxines sont décrites par le préfixe AF (Aflatoxine), les lettres B ou G se référant à la fluorescence bleue (B) ou verte (G) sous UV et les chiffres 1 et 2 indiquant s'il s'agit de composés majeurs ou mineurs (Alshannaq & Yu, 2020; Dalvi, 1986).

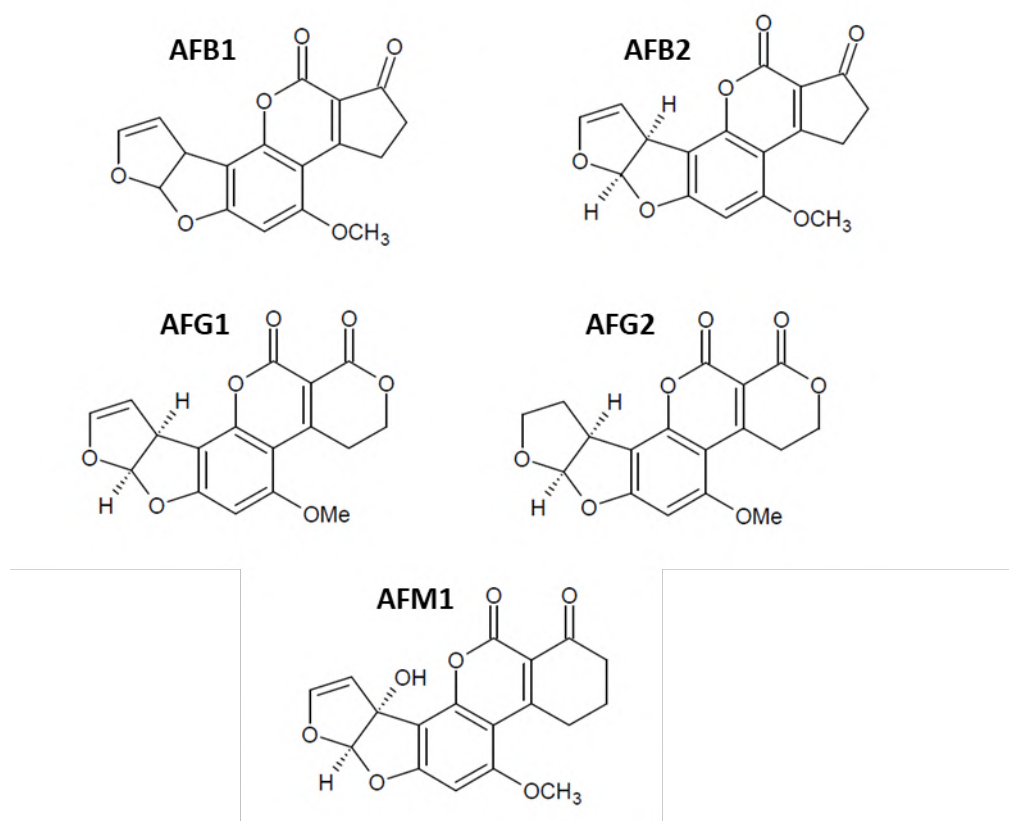


Figure 1. Structure des principales aflatoxines. Source personnelle

Les aflatoxines sont des dérivés de la difuranocoumarine, et sont classées en deux grands groupes selon leur structure chimique : les difurocoumaro-cyclopenténones (AFB1, AFB2, AFB2a, AFM1, AFM2, AFM2a et aflatoxicol) et les difurocoumaro-lactones (AFG1, AFG2, AFG2a, AFGM1, AFGM2, AFGM2, AFGM2a et AFB3) (Bbosa, 2013). Le squelette de l'AFB1 est l'analogue structurel de tous les autres types d'aflatoxines, avec quelques différences, comme le cycle cyclopenténone pour les toxines de type B, remplacé par une lactone dans la série G.

D'un point de vue physico-chimique, les aflatoxines se présentent sous forme de cristaux incolores, jaune pâle, liposolubles, et donc peu solubles dans l'eau (10-20 mg/L) mais solubles dans les solvants organiques modérément polaires, comme le chloroforme, le méthanol et le diméthylsulfoxyde (IARC, 2012; Jalili, 2016; V. Kumar, 2018). De par leur structure chimique aromatique, les aflatoxines peuvent être détectées par leur propriété d'absorption UV mais aussi grâce à leur fluorescence (Tableau 1).

Comme le montre le tableau 1, les masses molaires des principales aflatoxines sont comprises entre 312 et 330 Daltons. Ce sont des molécules très stables. Une fois purifiées, elles montrent une grande thermo-résistance, avec des températures de dénaturation allant de 237 à 289 °C. Elles sont également stables dans une gamme de pH allant de 3 à 10 (V. Kumar, 2018; Pankaj et al., 2018). Ces caractéristiques font de l'élimination des aflatoxines un défi majeur pour l'industrie alimentaire.

Tableau 1. Propriétés physiques et chimiques des principales aflatoxines

Aflatoxine	Formule moléculaire	Masse molaire	Point de fusion (°C)	Absorption UV (nm)	Emission de fluorescence (nm)
B1	C ₁₇ H ₁₂ O ₆	312	268-269	223,265,326	425
B2	C ₁₇ H ₁₄ O ₆	314	286-289	265,363	425
G1	C ₁₇ H ₁₂ O ₇	328	244-246	243,257,264,362	450
G2	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	330	237-240	265,363,	450

Source : (V. Kumar, 2018)

I.1.3 Toxicité

L'AFB1 est une molécule toxique pour l'homme et l'animal classée par le « International Agency for Research on Cancer (IARC) » dans le groupe 1 des molécules cancérogènes pour l'homme (IARC, 2002). Elle est très dangereuse en raison de sa mutagénicité et de sa génotoxicité. L'AFB1 est considéré comme un facteur de risque de carcinome du foie. Son métabolite, l'aflatoxine M1, est classé par le IARC dans le groupe 2B (possiblement cancérogène pour l'homme).

Il est nécessaire de mentionner qu'à partir de l'AFB1, d'autres métabolites peuvent être générés. Dans le paragraphe suivant, la voie métabolique de l'AFB1 après son ingestion est présentée, ainsi que son mécanisme d'action pour mieux comprendre l'importance d'éviter son ingestion.

I.1.3.1 Voies de métabolisation et mécanisme d'action de l'AFB1

Les aflatoxines agissent, chez l'homme comme chez l'animal, en se liant à l'ADN, à l'ARN et aux protéines, altérant leur synthèse. Après ingestion, l'AFB1 est absorbé dans l'intestin grêle où elle atteint la circulation sanguine et est transportée par les globules rouges et

les protéines plasmatiques jusqu'au foie où elle est métabolisée. Cette métabolisation entraînant l'apparition de l'AFB1-8,9-exo-époxyde, une molécule encore plus dangereuse, le foie est considéré comme l'organe cible principal de cette mycotoxine (Soriano, 2007).

Dans le foie, l'AFB1 subit plusieurs voies de métabolisation. Cette métabolisation est sous la dépendance du cytochrome P450 dans les cellules microsomales hépatiques. Elle peut suivre différentes voies (figure 2) :

1. L'AFB1 peut être métabolisée en un intermédiaire époxyde réactif ou être hydroxylé en aflatoxines moins nocives (AFM1, AFQ1 et AFP1) (Wild & Montesano, 2009; Wu & Khlangwiset, 2010). Cette voie est considérée comme la principale voie de détoxification des aflatoxines.
2. Une autre possibilité est d'avoir une oxydation initiale par laquelle l'AFB1 est transformée en deux composés époxy : l'AFB1-8,9-endo-époxyde et l'AFB1-8,9-exo-époxyde (AFBO), qui est très instable et réagit avec les bases guanine de l'ADN pour former des adduits aflatoxine-N7-guanine. C'est cette capacité à entraîner la formation d'adduits qui confère des propriétés mutagènes à l'AFB1. En effet, la transversion de la base G à la base T à la troisième position du codon 249 du gène p53 est un facteur contribuant à la formation de tumeurs du foie et finalement du carcinome hépatocellulaire (CHC) (D. Li et al., 1993; Macé et al., 1997; Rawal & Coulombe, 2011; Sudakin, 2003).
3. Une fois l'AFBO formé, il peut être conjugué au glutathion pour être éliminé par détoxification hépatique, par l'enzyme glutathion-s-transférase (GST). C'est l'étape de détoxification la plus importante pour la protection contre la génotoxicité de l'AFB1 car elle empêche la liaison de l'époxyde à l'ADN et à diverses protéines cellulaires (Johnson et al., 1997; Sherratt & Hayes, 2002). Par conséquent, l'activité de la GST est un facteur crucial pour déterminer la résistance à l'effet toxique des aflatoxines.
4. Enfin, l'exo- et l'endo-époxyde peuvent également être convertis de manière non enzymatique en AFB1-8,9-dihydrodiol, qui peut à son tour être transformé en ion dialdéhyde phénolate lorsqu'il est catalysé par une base. Le dialdéhyde peut suivre deux voies : former des bases de Schiff avec les résidus de lysine de l'albumine sérique pour former un complexe aflatoxine-albumine ou être

réduit en dialcool dans une réaction catalysée par l'enzyme aflatoxine aldéhyde réductase (AFAR) pour être excrété (Bbosa et al., 2013).

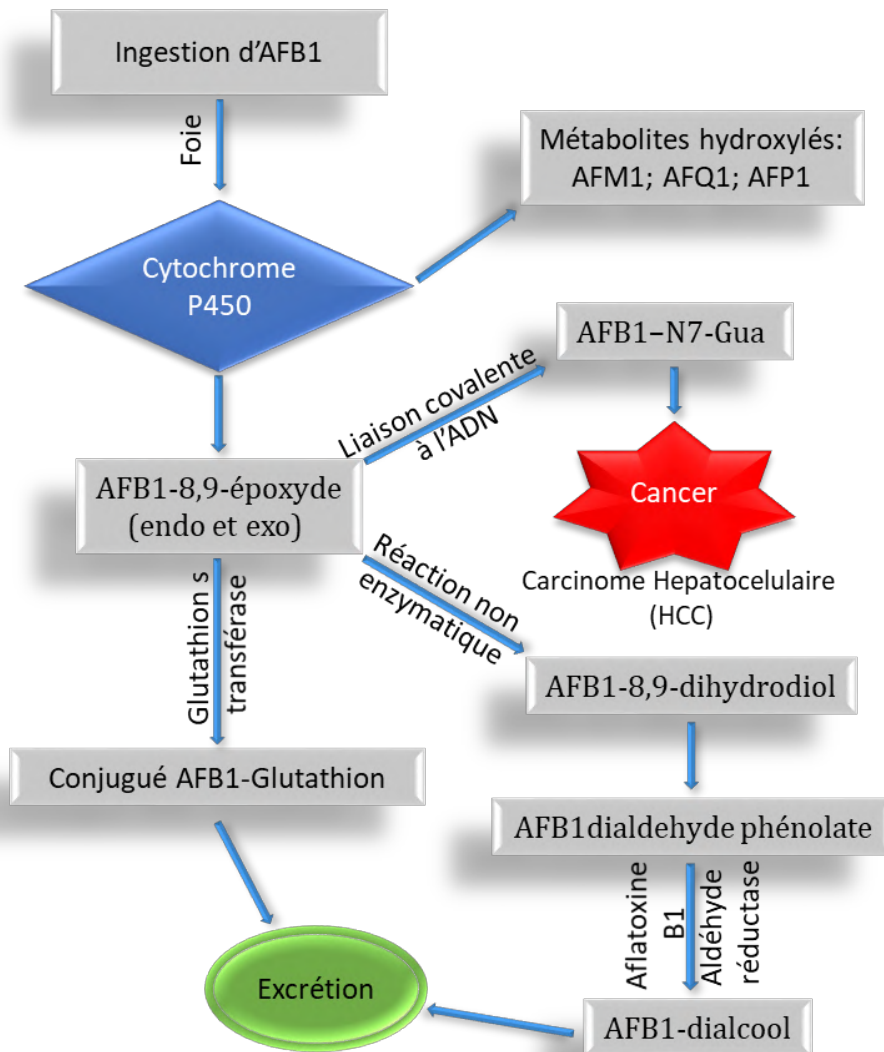


Figure 2. Différentes voies de métabolisation de l'AfB1.

La toxicité de l'AfB1 dépend de différents paramètres comme la concentration de la toxine et la durée d'exposition mais aussi l'âge, le sexe, l'espèce animale concernée et sa tolérance, son état de santé, etc (Ellis et al., 1991). En prenant en compte les paramètres de concentration et de durée d'exposition, on distingue deux types de toxicité : aiguë et chronique.

La toxicité aiguë apparaît après une exposition à des doses élevées sur une période courte, tandis que la toxicité chronique se traduit par des effets à moyen et long terme après une exposition régulière ou prolongée à des doses faibles à modérées.

I.1.3.2 Toxicité aiguë

Elle peut se traduire par des hémorragies, des lésions hépatiques aiguës, des troubles de la digestion, de l'absorption et du métabolisme des nutriments et, dans le pire des cas, la mort, avec un taux de mortalité documenté pouvant atteindre 40 % (Bbosa et al., 2013). Le tableau 2 montre la dose d'exposition létale 50 à l'AFB1 dans différentes espèces animales.

Tableau 2. DL50 de l'aflatoxine B1 dans différentes espèces animales (Dharumadurai et al., 2011).

Espèce	DL50 orale (mg/kg poids corporel)
Embryon de poussin	0,025
Caneton	0,3
Dinde	0,5
Poulet	2,0
Mouton	5,0
Rat (mâle)	7,2
Rat (femelle)	17,9
Lapin	0,3
Chat	0,6
Chien	1,5
Cochon	0,6
Cochon d'Inde	1,4
Hamster	10,2
Souris	9,0
Babouin	2,0

Grâce aux réglementations sanitaires et aux méthodes de prévention mises en oeuvre pour limiter la contamination des aliments, l'aflatoxicose aiguë chez l'homme n'est pas

courante de nos jours. Cependant, ces intoxications se produisent encore dans certaines régions. Elles sont généralement liées à des pénuries alimentaires, ce qui oblige la population à consommer des matières premières qui, dans des conditions normales, seraient exclues de la consommation.

L'un des premiers rapports documentés d'un effet significatif des aflatoxines sur l'homme est survenu lors d'une intoxication dans l'ouest de l'Inde en 1974. Sur les 397 personnes touchées par l'empoisonnement à l'aflatoxine B1, 108 sont mortes (Krishnamachari et al., 1975).

Un autre exemple plus récent s'est produit au Kenya en 2004, où un total de 317 cas ont été signalés, incluant des enfants et des adultes de 4 districts différents. Parmi les victimes, 125 sont mortes et l'intoxication a été reliée à la consommation de grains de maïs cuits contaminés par de fortes concentrations d'AFB1 (> 1000 ppb). Ce maïs, visiblement altéré par le développement fongique, n'aurait pas dû être consommé mais la pénurie alimentaire a entraîné son ingestion par la population (Centers for Disease Control and Prevention & Gieseke, 2004; Lewis et al., 2005).

I.1.3.3 Toxicité chronique

Cette intoxication se produit en cas d'exposition prolongée à l'AFB1, mais en quantité faible à modérée. Les signes cliniques sont souvent difficiles à identifier car d'autres maladies présentent une symptomatologie similaire (Storm et al., 2014). Les symptômes les plus courants sont l'immunosuppression, la tératogenèse, la mutagenèse, et l'apparition de différents carcinomes, le carcinome du foie étant le plus fréquent (Carvajal, 2013). L'exposition à la toxine peut être mise en évidence en dosant certains métabolites de l'AFB1 dans différents fluides biologiques tels que le sang, le lait et l'urine (Williams et al., 2004).

Le principal effet toxique de l'AFB1 reste lié à son hépatotoxicité et à l'interaction entre le dérivé époxy et l'ADN des hépatocytes. Des études épidémiologiques menées dans plusieurs régions d'Afrique et d'Asie indiquent une forte corrélation entre une exposition prolongée aux aflatoxines et le cancer primaire du foie (Ngindu et al., 1982). Par conséquent, une exposition prolongée à de faibles doses d'aflatoxines par la consommation d'aliments peut entraîner sur le long terme un carcinome hépatocellulaire (Fung & Clark, 2004).

I.1.3.3.1 Effet immunosuppresseur

Le système immunitaire peut être affecté par certains contaminants tels que les aflatoxines, ce qui entraîne de graves effets négatifs sur la santé. De nombreuses études ont montré que les mycotoxines affectent négativement le système immunitaire et augmentent la susceptibilité aux maladies (Hussein & Brasel, 2001; Jiang et al., 2005; Mohsenzadeh et al., 2016; Sharma, 1993).

Il a également été démontré que l'exposition chronique aux aflatoxines a un effet immunosuppresseur direct sur le système immunitaire, tant chez l'homme que chez l'animal (Bondy & Pestka, 2000; Ghosh et al., 1991; Jiang et al., 2005, 2008).

En outre, il a été démontré que les personnes exposées à des niveaux élevés d'aflatoxines par le biais de l'alimentation augmentent leur sensibilité à diverses maladies causées par des bactéries, des protozoaires et des virus, comme le VIH/sida et la tuberculose symptomatique (Jiang et al., 2008; Keenan et al., 2011) et que l'AFB1 modifie l'activité des cellules NK, altère la fonction des macrophages et supprime l'activité phagocytaire (Dugyala & Sharma, 1996; Sharma, 1993).

I.1.3.3.2 Effet tératogène

Il a été démontré que l'AFB1 produit une réduction significative du poids corporel et une croissance limitée des fœtus chez les souris. En outre, elle provoque également des malformations et un retard de maturation osseuse (Abdulrazzaq et al., 2011). Des effets tératogènes ont également été mis en évidence chez d'autres animaux comme le lapin, les plus importants étant des malformations oculaires et des anomalies générales du squelette (SM et al., 2013).

Chez l'homme, des adduits aflatoxine-albumine (AF-ALB), (correspondant à la deuxième voie du métabolisme de l'AFB1 mentionnée précédemment) ont été identifiés dans le sang maternel et le sang du cordon ombilical de nouveau-nés en Gambie (Wild et al., 1991). Ce même phénomène a été observé, des années plus tard, dans le sang maternel et le sang du cordon ombilical dans la même région d'Afrique, Il a été démontré que la toxine peut passer de la mère au fœtus par le cordon ombilical et retarder le développement du fœtus pendant la grossesse (Turner et al., 2007).

I.1.3.3.3 Effets mutagènes et cancérogénicité

L'AFB1 est le cancérigène naturel le plus puissant connu. Classée par le IARC dans le groupe 1 des molécules cancérigènes pour l'homme et l'animal (IARC, 2002). Depuis sa découverte en 1960, l'aflatoxine a été identifiée comme étant un puissant hépatocarcinogène chez les rats de laboratoire (Stoloff, 1989) et, depuis, de nombreuses recherches ont été menées pour évaluer son pouvoir cancérigène chez l'homme.

Comme expliqué dans la section 1.3.1, la métabolisation par le cytochrome P450 de l'AFB1 en aflatoxine B1-8,9-exo-époxyde entraîne l'apparition d'adduits à l'ADN, qui sont à l'origine de la cancérogenèse (Rushing & Selim, 2019). Des biomarqueurs tels que les adduits AFB1-ADN ont été retrouvés dans les tissus normaux et tumoraux de personnes atteintes de carcinome hépatocellulaire (CHC) (Turner et al., 2012).

Avec 787 200 décès dans le monde en 2018, le carcinome hépatocellulaire est l'une des principales causes de décès par cancer dans le monde si on considère à la fois les hommes et les femmes (troisième cause de décès chez les hommes) (Bray et al., 2018). On estime qu'à l'échelle mondiale, les aflatoxines sont la principale cause de CHC. Ces toxines seraient responsables de 4,6 % à 28,2 % des cas (Y. Liu & Wu, 2010). Cependant, il est nécessaire de souligner que le risque que l'AFB1 induise un hépatocarcinome dépend des populations et de la région.

Il existe de nombreuses études sur la relation entre l'AFB1 et l'hépatocarcinome. La détection de l'adduit AFB1-N7-guanine (un biomarqueur d'expositions à l'AFB1 et de l'apport alimentaire en AFB1), a été montré comme ayant une association significative avec le CHC (Asim et al., 2011). On pense que l'AFB1 provoque la tumorigenèse en générant la formation d'adduits à l'ADN, ce qui entraîne une lecture de l'ADN aberrante et l'apparition de mutations dans les cellules hépatiques. Ces dernières peuvent toucher notamment le gène p53 appelé « suppresseur de tumeur » (Hamid et al., 2013). Il a été démontré que les CHC liés à l'AFB1 portent la transversion AGG-to-AGT au niveau du codon 249 du gène p53 et que, lorsque cette protéine est mutée, elle présente un gain de fonction oncogène (J. Li & Liu, 2019). Au vu de ce qui précède, il existe des preuves suffisantes pour conclure que l'AFB1 a un effet sur l'apparition du carcinome hépatocellulaire chez l'homme.

Compte tenu de la toxicité de l'AFB1 chez l'homme, on peut affirmer qu'il est nécessaire de limiter l'exposition aux aflatoxines. Pour y parvenir, des règles et réglementations ont été établies.

I.1.4 Règlementation

En raison de leur génotoxicité, le JECFA (Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires) n'a pas établi de dose maximale tolérable (DMT) pour la consommation d'aflatoxines. Il convient donc de s'attacher à réduire l'exposition aux aflatoxines au niveau le plus bas raisonnablement atteignable (règle ALARA : "As Low As Reasonably Achievable"). Ce principe a été appliqué aux aflatoxines en 1998 (FAO/WHO, 1999).

Plus de 100 pays ont défini des seuils concernant les teneurs admissibles en aflatoxines dans les aliments. Ces seuils varient en fonction des pays. La limite la plus utilisée au sein de l'UE varie entre 5, 10 y 20 µg/kg d'aliment. La limite de 20 µg/kg d'aliments est fréquemment utilisée par les pays d'Amérique Latine et d'Afrique mais aussi aux États-Unis (J. Yu, 2012).

Les réglementations peuvent concerner soit l'AFB1, soit la somme des aflatoxines. A titre d'illustration, le Tableau 3 représente les valeurs fixées dans certains pays.

Tableau 3. Teneurs maximales tolérées en aflatoxines dans les denrées alimentaires, les produits laitiers et les aliments pour animaux (FAO, 2004).

Pays	Aliment	Aflatoxine	Limite (µg/kg)
ALGÉRIE	Arachides, noix, céréales	AFB1	10
		AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	20
	Alimentation du bétail	AFB1	20
ARMÉNIE	Tous les aliments	AFB1	5
	Lait	AFM1	0,5
AUSTRALIE	Arachides, noix	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	15
BARBADE	Tous les aliments	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	20
	Lait	AFM1	0,5

	Tous les aliments pour animaux	AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	50
BÉLIZE	Maïs, arachides	AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	20
BÉLARUS	Céréales, légumineuses	AFB1	5
	Beurre, concentré de protéines de lait	AFM1	0,5
BOSNIE- HERZÉGOVINE	Blé, maïs, riz, céréales	AFB1, AFG1	1
	Haricots	AFB1, AFG1	5
CUBA	céréales, arachides, pâte de cacao	AFB1	5
	tous les aliments	AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	5
RÉPUBLIQUE DOMINICAINE	Maïs(produits), arachides, soja, tomates(produits)	AFB1, AFG1	0
	Maïs importé	AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	20
EGYPTE	Arachides et céréales	AFB1	5
		AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	10
	Maïs	AFB1	10
		AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	20
	Aliments pour animaux et poulets	AFB1	10
		AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	20
UNION EUROPÉENNE	Arachides, noisettes et les fruits secs et leurs produits transformés, destinés à la consommation humaine directe ou comme ingrédient de denrées alimentaires	AFB1	2
		AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	4
		AFB1	8

	Arachides devant être soumises à un tri ou à un autre traitement physique avant la consommation humaine ou l'utilisation comme ingrédient dans les denrées alimentaires	AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	15
	Fruits à coque et fruits secs devant être soumis à un tri ou à un autre traitement physique avant la consommation humaine ou l'utilisation comme ingrédient dans des denrées alimentaires	AFB1	5
		AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	10
	Céréales (y compris le sarrasin) et leurs produits transformés destinés à la consommation humaine directe ou à être utilisés comme ingrédient dans des denrées alimentaires	AFB1	2
		AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	4
	Maïs doit être soumis à un tri ou à un autre traitement physique avant la consommation humaine ou l'utilisation comme ingrédient dans les denrées alimentaires	AFB1	5
		AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	10
	Épices : <i>Capsicum spp.</i> (Fruits secs de ces produits, entiers ou moulus, y compris piments, poudre de piment, poivre de Cayenne et paprika); <i>Piper spp.</i> (fruits de ceux-ci, y compris le poivre blanc et noir); <i>Myristica fragrans</i> (muscade); <i>Zingiber officinale</i> (gingembre); <i>Curcuma longa</i>	AFB1	5
		AFB1, AFB2, AFG1, AFG2	10
	Lait (lait cru, lait pour la fabrication de produits à base de lait et lait traité thermiquement)	AFM1	0,05

	Toutes les matières premières pour aliments des animaux	AFB1	20
	Aliments complets pour bovins, ovins et caprins à l'exception : - aliments complets pour animaux laitiers - aliments complets pour veaux et agneaux		20
	Aliments complets pour animaux laitiers		5
	Aliments complets pour veaux et agneaux		10
	Aliments complets pour porcs et volailles (à l'exception des jeunes animaux)		20
	Autres aliments complets		10
	Aliments complémentaires pour bovins, ovins et caprins (à l'exception des aliments complémentaires pour animaux laitiers, veaux et agneaux)		20
	Aliments complémentaires pour porcs et volailles (sauf jeunes animaux)		20
	Autres aliments complémentaires		5
MERCOSUR	Arachides, maïs et produits dérivés	AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	20
	Lait liquide	AFM1	0,5
	Lait en poudre		5
MEXIQUE	Céréales et produits	AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	20
	Farine de maïs pour tortillas		12
	Céréales pour aliments d'engraissement pour bovins et porcins		200
	Aliments pour bovins laitiers/volailles		0

ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE	Tous les aliments sauf le lait	AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	20
	Lait	AFM1	0.5
	Produits à base de maïs et d'arachide destinés à bovins de boucherie en finition	AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	300
	Tourteaux de graines de coton destiné aux bovins de boucherie, aux porcs ou à la volaille		300
	Produits à base de maïs et d'arachide destinés à l'élevage de bovins de boucherie, de porcs d'élevage ou de volaille adulte		100
	Maïs, produits d'arachide et autres aliments pour animaux et ingrédients d'aliments pour animaux, à l'exclusion de la farine de graines de coton, destinés aux animaux immatures		20
	Maïs, produits à base de maïs, tourteaux de coton et autres aliments pour animaux et ingrédients destinés aux animaux laitiers, aux espèces animales ou aux utilisations non spécifiées ci-dessus, ou lorsque l'utilisation prévue n'est pas connue		20
PÉROU	Arachides crues et transformées	AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	15
	Lait	AFM1	0.5
VENEZUELA	Maïs, farine de maïs, arachides, beurre d'arachide	AFB1,AFB2, AFG1, AFG2	20
	Lait liquide	AFM1	0,5
	Lait en poudre		5

I.2 Biosynthèse de l'AFB1

I.2.1 Espèces productrices

Pendant plusieurs décennies, les espèces *A. flavus* et *A. parasiticus* ont été considérées comme les seules espèces capables de produire des aflatoxines. Cependant, ces dernières années, grâce au développement de la biologie moléculaire, la liste des espèces productrices d'aflatoxines s'est allongée et continue d'augmenter, toutes appartenant au genre *Aspergillus* et réparties dans les sections : *Flavi*, *Nidulans* et *Ochraceorosei* (Frisvad et al., 2019). La majorité des espèces aflatoxinogènes font partie de la section *Flavi*. Cette section est, à l'heure actuelle, constituée de 34 espèces dont 19 sont capables de produire des aflatoxines (tableau 4). Cependant, ces différentes espèces sont beaucoup moins fréquentes que les deux principales espèces qui restent *A. flavus* et *A. parasiticus*.

Tableau 4. Espèces productrices d'aflatoxines appartenant aux sections *Flavi*, *Ochraceorosei* et *Nidulantes*, adapté de Varga et al., (2015) et Frisvad et al., (2019).

Espèce	Aflatoxines produites	Autres composés produits
<i>Aspergillus</i> section <i>Flavi</i>		
<i>A. aflatoxiformans</i>	B1,B2,G1,G2	AA, ACP, AK, VERS, aflatrèmes, aflavarines, aflavinines, aspirochlorine, paspaline, paspalinine
<i>A. arachidicola</i>	B1,B2,G1,G2	AA, DTP, AK, chrysogine, miyakamides, parasiticolides
<i>A. austwickii</i>	B1,B2,G1,G2	ACP, AK, VERS, aflatrems, aflavarines, paspaline, paspalinine, métabolite gfn
<i>A. bombycis</i>	B1,B2,G1,G2	AA,AK
<i>A. cerealis</i>	B1,B2,G1,G2	ACP, AK, VERS, aflatrems, aflavarines, aflavazole, paspaline, paspalinine
<i>A. flavus</i>	B1,B2	AA, ACP, DTP, AK, aflatrèmes, aflavarines, aflavinines, asperfurane, aspirochlorine, citréoisocoumarine, flavimine, miyakamides, paspaline, paspalinine

<i>A. luteovirescens</i>	B1, B2, G1, G2	
<i>A. minisclerotigenes</i>	B1,B2,G1,G2	AA, ACP, AK, aflatrem, aflavarines, aflavazole, aflavinines, parasiticolides, paspalinine
<i>A. mottae</i>	B1,B2,G1,G2	AA, ACP, AK, ST, VERS, aflavinine, parasiticol, paspalinine
<i>A. nomius</i>	B1,B2,G1,G2	AA, AK, AT, ST VERS, anominine, aspernomine, miyakamide, parasiticol, paspaline, paspalinine, pseurotine A
<i>A. novoparsiticus</i>	B1,B2,G1,G2	DTP, AK, aspirochlorine, miyakamides, parasiticolide
<i>A. parasiticus</i>	B1,B2,G1,G2	AA, AK, parasperone, parasiticol, parasiticolide A et B
<i>A. parvisclerotigenus</i>	B1,B2,G1,G2	AK, ACP
<i>A. pseudocaelatus</i>	B1,B2,G1,G2	ACP, DTP, AK, AT, aspirochlorine,
<i>A. pseudonomius</i>	B1	AA, AK, AT, chrysogine, miyakamide,
<i>A. pseudotamarii</i>	B1,B2,G1,G2	ACP, AK, AT, aflavinines, altersolanol, aspirochlorine, paspaline, paspalinine
<i>A. sergii</i>	B1,B2,G1,G2	AA, ACP, AK, VERS, aflatrem, aflavazole, aflavarine, aflavinines, asperfuran, paspalinine
<i>A. togoensis</i>	B1	bisidérine, paspaline, paspalinine, stérigmatocystine, paxilline
<i>A. transmontanensis</i>	B1,B2,G1,G2	AK, aspirochlorine, miyakamide
<i>Aspergillus section Ochraceorosei</i>		
<i>A. ochraceoroseus</i>	B1,B2	TR
<i>A. rambellii</i>	B1,B2	TR
<i>Aspergillus section Nidulantes</i>		
<i>A. astellatus</i>	B1	ST, TR
<i>A. olivicola</i>	B1	ST, TR
<i>A. venezeulensis</i>	B1	ST, TR

AA = acide aspergillique, ACP = acide cyclopiazonique, AK = acide kojique, AT = acide tenuazonique, ST = stérigmatocystine, TR = terréine. DTP = ditryptophénaline

Aspergillus flavus

Aspergillus flavus est une espèce fongique contaminant fréquemment de nombreuses cultures, notamment le maïs, dans les zones où les conditions hydrothermales sont favorables à sa croissance (Cary et al., 2011; Massomo, 2020).

La croissance d'*A. flavus* est possible entre 25 et 37°C et sa température optimale de croissance est proche de 33°C (Pitt & Hocking, 2009). Il est présent entre les latitudes 16° et 35° et peu fréquent au-dessus de 45°, même si les changements climatiques en cours vont modifier cette répartition. *A. flavus* est fréquemment présent dans les régions à climat chaud, semi-aride ou subtropical (Amaike & Keller, 2011; Klich, 2007).

Bien qu'il ait été rapporté initialement que *A. flavus* pouvait produire des aflatoxines de type B et G (Nesbitt et al., 1962), des études ultérieures ont démontré qu'il ne peut produire que les aflatoxines B1 et B2 et, souvent, l'acide cyclopiazonique (ACP) (Amaike & Keller, 2011; Varga et al., 2009). La production des aflatoxines B et G est observée chez *A. parasiticus*. Cependant, certaines souches d'*A. flavus* ont néanmoins été signalées comme pouvant produire des aflatoxines de type G (Frisvad et al., 2019).

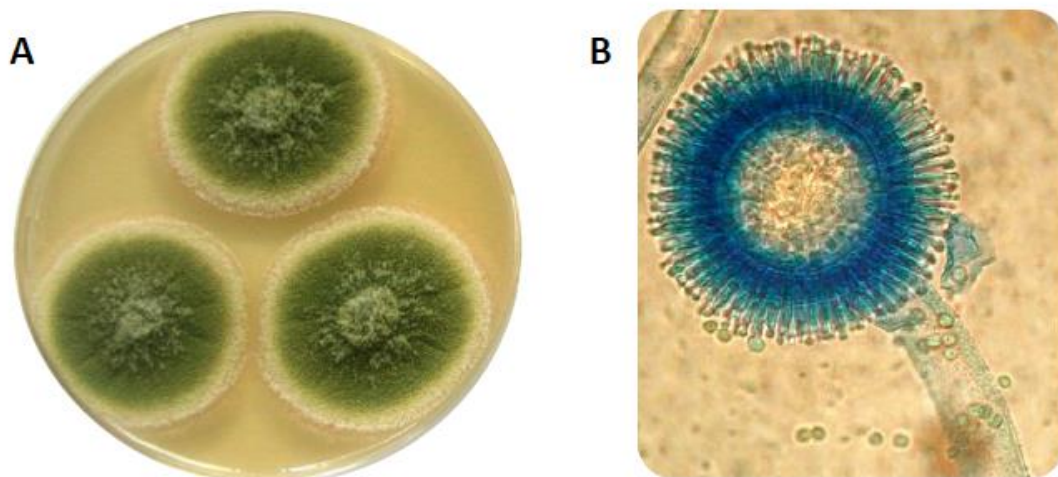


Figure 3. Photographie d'une colonie d'*Aspergillus flavus* sur Malt Extract Agar (MEA) après 5 jours de culture à 27°C. **A.** Aspect macroscopique. **B.** Conidiophore classique portant une tête radiée bisériée, vue au microscope X 400 (photos S. Bailly).

I.2.2 Conditions de développement et de toxinogénèse

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires et leur production est donc étroitement liée aux conditions environnementales dans lesquelles se développe la souche fongique.

Les principaux paramètres environnementaux qui affectent ou modulent la production d'aflatoxines sont énumérés ci-dessous.

I.2.2.1 Paramètres environnementaux

- Température

Un facteur affectant directement la production d'aflatoxines est la température. La température optimale pour la production d'aflatoxine se situe entre 28 et 30 °C. Lorsque la température dépasse 36°C, la production d'aflatoxines est presque totalement inhibée (OBrian et al., 2007).

- Activité de l'eau

L'activité de l'eau (a_w) est un paramètre de grande importance dans la colonisation fongique d'un substrat. Pour synthétiser des aflatoxines, *A. flavus* a besoin d'une a_w minimale de 0,85. Cependant, la production optimale est observée pour des a_w comprises entre 0,93 et 0,99 (Battilani et al., 2013; Gallo et al., 2016). Par contre, il a été démontré qu'*A. flavus* peut se développer sur des substrats avec une a_w de 0,78-0,8 (Bhat et al., 2010).

- Source de carbone

Les sucres sont les hydrates de carbone qui favorisent une production plus élevée d'AFB1 car ils génèrent des unités initiatrices de polyketide telles que l'acétyl-CoA (Caceres et al., 2020). Les sucres simples tels que le glucose (meilleur glucide pour la production d'aflatoxines), le fructose, le saccharose et le maltose sont considérés comme des sources de carbone qui optimisent le développement d'*A. flavus* et la production d'aflatoxines (Bhatnagar et al., 2006; J. Liu et al., 2016).

- Source d'azote

La présence d'azote est étroitement liée à la production d'aflatoxines. Certains substrats (asparagine, aspartate, alanine, nitrate d'ammonium, nitrite d'ammonium, sulfate d'ammonium, glutamate, glutamine et proline) favorisent la production d'aflatoxines,

tandis que d'autres (nitrate de sodium et nitrite de sodium) ne le font pas, et même certains comme le nitrate peuvent réprimer la formation d'aflatoxines (J. Yu, 2012).

- pH

Le pH influence directement le développement d'*A. flavus* ainsi que la synthèse des aflatoxines. La biosynthèse des aflatoxines chez *A. flavus* se produit en milieu acide et neutre, mais est inhibée en milieu alcalin. La croissance optimale d'*A. flavus* se produit à un pH compris entre 3,4 et 10 (Wheeler et al., 1991), et un pH proche de 6 favorise la synthèse des aflatoxines (Ritter et al., 2011).

À l'heure actuelle, il est largement admis qu'AFB1 est un contaminant important dans les régions tropicales et subtropicales, où les conditions climatiques chaudes favorisent le développement d'espèces aflatoxigènes. Cependant, le réchauffement climatique pourrait modifier la répartition des aflatoxines et provoquer leur apparition dans des zones considérées jusque là sans risque comme l'Europe.

En 2007, une enquête de l'Agence européenne de sécurité des aliments (EFSA) a montré que la contamination par les aflatoxines des cultures agricoles au sein de l'UE et en particulier dans le sud de l'Europe était un problème émergent (EFSA, 2007). Depuis cette date, la présence d'aflatoxines a été signalée dans différentes productions européennes, principalement le maïs, dans des pays comme la Roumanie, l'Italie, l'Espagne, la Croatie et la France (Bailly et al., 2018). Par conséquent, à l'heure actuelle, on peut dire que les aflatoxines sont devenues un problème mondial et que dans les années à venir, elles pourraient apparaître dans un plus grand nombre de pays et augmenter leur présence dans les pays où elles sont déjà présentes.

I.2.2.2 Aliments contaminés

De par les caractéristiques physiologiques des espèces productrices et leur caractère xénophile, les aflatoxines peuvent contaminer les productions au champ, mais aussi plus tard, au cours du stockage si le séchage est insuffisant ou qu'il y a une réhumidification. Ainsi, ces mycotoxines peuvent contaminer une grande variété d'aliments destinés à la consommation humaine et/ou animale tels que le maïs, les arachides, les noix... On peut aussi les retrouver secondairement (dérivé hydroxylé) dans la viande et les produits laitiers (tels que le lait et le fromage) d'animaux exposés aux toxines pendant la phase

d'élevage, si les animaux sont nourris avec des aliments contaminés par les aflatoxines (Di Natale et al., 2009; Mahato et al., 2019; Vila-Donat et al., 2018).

Les céréales, les légumineuses et les sous-produits à base de céréales constituent une source très importante d'alimentation humaine dans le monde entier, en raison de leur haute valeur nutritionnelle (Temba et al., 2017).

D'autres substrats peuvent aussi être contaminés par l'AFB1 comme les épices, les figues, les noix, les cacahuètes, les fruits secs, le café et le cacao (Juan et al., 2008; Mahgubi et al., 2013; Martinez-Miranda et al., 2019; Nakajima et al., 1997; Sánchez-Hervás et al., 2008; Taniwaki et al., 2018). L'AFM1 peut être trouvée en grande quantité dans le lait et est stable au traitement thermique (C. Oliveira et al., 2002). Comme les céréales, le lait et ses dérivés sont des produits de forte consommation, qui représentent une part essentielle de l'alimentation.

Que ce soit directement ou lors de la transformation des aliments pour bébés, la présence d'aflatoxine M1 constitue une menace pour la sécurité des aliments (Di Natale et al., 2009). En outre, l'AFM1 peuvent également être transférée aux nourrissons par le lait des mères consommant des aliments contaminés par l'AFB1 (Elzupir et al., 2012).

La contamination des aliments par les aflatoxines est fréquente dans de nombreux pays. Pour illustrer ce problème, le tableau 5 récapitule quelques résultats d'enquêtes récentes sur la contamination de certains aliments par les aflatoxines dans différents pays. Le plus souvent, un pourcentage élevé d'échantillons a été identifié comme étant contaminé par une ou plusieurs aflatoxines, à des concentrations qui excèdent parfois fortement les normes en vigueur pour ces contaminants.

Tableau 5. Contamination par les aflatoxines de différents produits alimentaires dans le monde.

Région	Pays	Matrice alimentaire	aflatoxine	Niveau de contamination (µg/kg)	Références
Europe	Croatie	Maïs	AFB1	1,1-20,72	Pleadin et al., 2015, 2014
	Grèce	Lait	AFM1	0,005-0,02	Tsakiris et al., 2013

	Italie	Farine de maïs	AFB1	0,17-3,75	Armorini et al., 2015
	Italie	Lait(vache / buffle)	AFM1	0,004	De Roma et al., 2017
	Italie	Épices	AFB1	0,59-5,38	Prelle et al., 2014
	Portugal	Lait (Vache)	AFM1	0,005-0,07	Duarte et al., 2013
	Serbie	Maïs	Toutes les AFs	1,01-86,1	Kos et al., 2013
	Serbie	Lait UHT + pasteurisé	AFM1	0,01-1,2	Kos et al., 2014; Škrbić et al., 2014
	Serbie	Formule infantile	AFM1	0,03-0,02	Torovic, 2015
Amérique	Brésil	Noix de cajou	Toutes les AFs	0,60-31,50	Milhome et al., 2014
	Brésil	Lait (Vache)	AFM1	0,05	Picinin et al., 2013
	Brésil	Lait UHT	AFM1	1-4,2	Oliveira et al., 2013
	Costa Rica	Blé	Toutes les AFs	24	Granados-Chinchilla et al., 2017
	États Unis	Piments	AFB1	<2	Singh and Cotty, 2017
Asie de l'Est	Chine	Maïs pour fourrage	AFB1	2-300	Liu et al., 2016
	Chine	Riz	AFB1	0,03-20	Lai et al., 2015
	Chine	Riz	AFB1	0,1-136,80	Sun et al., 2011
	Chine	Lait UHT		0,048	Zheng et al., 2013
		Lait pasteurisé	AFM1	0,072	
	Chine	Yaourt	AFM1	0,05	Guo et al., 2013
	Japon	Noisettes	AFB1	0,17-2,59	Kumagai et al., 2008
	Taiwan	Produits d'arachide	Toutes les AFs	0,2-523,4	Chen et al., 2013
Vietnam	Maïs	AFB1	1,0-34,80	Lee et al., 2017	

	Arabie Saoudite	Noisettes	Toutes les AFB1	1,0-110	Neamatallah and Serdar, 2013	
	Iran	Lait cru Lait pasteurisé	AFM1	0,007-0,068 0,001-0,0581	Mohajeri et al., 2015	
	Iran	Lait Vache Yaourt	AFM1	0,006-0,18 0,006-0,021	Bahrani et al., 2016	
	Liban	Produits laitiers divers	AFM1	32,77	Hassan and Kassaify, 2014	
	Turquie	Amande	AFB1	1-13	Gürses, 2006	
	Turquie	Beurre	AFB1	0,001-0,100	Aycicek et al., 2005	
Asie occidentale	Turquie	Farine de maïs	AFB1	0,41-1,12	Kara et al., 2015	
	Turquie	Fromage frais	AFM1	0,1-0,70	Yaroglu et al., 2005	
	Turquie	Alimentation animale	AFB1	0-5	Yalcin et al., 2017	
	Turquie	Figues	Toutes les AFB1	0,1-28,20	Kabak, 2016	
	Turquie	Noisette	AFB1	0,07-43,60	Baltaci et al., 2012	
	Turquie	Lentille	AFB1	0,57-1,74	Baydan et al., 2016	
	Turquie	Farine de maïs	AFB1	0,041-1,12	Kara et al., 2015	
	Turquie	Poudre de piment rouge	AFB1	0,025-40,90	Aydin et al., 2007	
	Asie du sud	Inde	Maïs	AFB1	20,6-402,4	Mohana et al., 2014

	Inde	Maïs	AFB1	48-383	Mudili et al., 2014
	Inde	Riz	AFB1	0,1-308	Reddy et al., 2009
	Malaisie	Épices	AFB1	0,58-4,64	Reddy et al., 2011
		Blé	AFB1	0,55-5,07	
	Pakistan	Fruits secs	AFB1	0,04-9,80	Masood et al., 2015
	Pakistan	Riz	AFB1	0,04-21,30	Iqbal et al., 2016
	Pakistan	Lait	AFM1	0,004-0,845	Iqbal and Asi, 2013
		Yaourt		0,004-0,616	
		Fromage blanc		0,004-0,596	
		Fromage à tartiner		0,004-0,456	
		Beurre		0,004-0,413	
Afrique	Afrique du Sud	Maïs	AFB1	1-73	Mngqawa et al., 2016
	Egypte	Produits carnés	Toutes les AFs	0,47-2,10	Abd-Elghany and Sallam, 2015
	Ethiopie	Arachides	Toutes les AFs	11-11900	Chala et al., 2013
	Malawi	Chips à base de maïs	AFB1	0,1-1,4	Matumba et al., 2014
		Préparation pour les enfants		0,5-5,2	
	Nigeria	Maïs	AFB1	0,14-0,22	Okeke et al., 2015
	Nigeria	Gingembre	Toutes les AFs	0,11-9,52	Lippolis et al., 2017
	Tunisie	Sorgho	AFB1	0,4-25,1	Ghali et al., 2010
		Blé		0,12-18	
	Zambie	Cacahuètes	AFB1	0,015-46,60	Bumbangi et al., 2016
Zimbabwe	Maïs	AFB1	0,75-26,6	Murashiki et al., 2017	

I.2.3 Voie de biosynthèse et régulation de l'AFB1

I.2.3.1 Le cluster de gènes de la voie de biosynthèse

Un cluster est un groupe gènes qui synthétisent ensemble un produit, comme un métabolite secondaire. Les gènes impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines sont souvent regroupés en cluster.

Chez le genre *Aspergillus*, l'ADN est constitué de 8 chromosomes. Les gènes responsables de la biosynthèse des aflatoxines se trouvent dans le cluster 54 situé à 80 Kilobases (Kb) du télomère du chromosome 3 (Caceres et al., 2020; Georgianna & Payne, 2009). Ce cluster s'étend sur une région de 75 Kb et comprend 30 gènes. Il est principalement régulé par deux gènes régulateurs internes : *aflR* et *aflS* (Figure 4) (Caceres et al., 2020; Chang, 2003; J. Yu & Ehrlich, 2011)

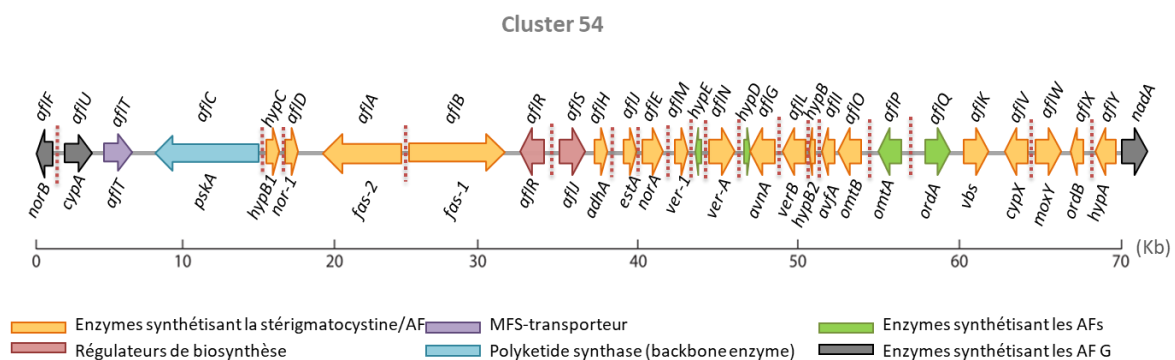


Figure 4. Organisation des 30 gènes du cluster responsable de la biosynthèse des aflatoxines chez *A. flavus*.

I.2.3.2 Cascade enzymatique conduisant à la synthèse des aflatoxines

La production d'aflatoxines est le résultat d'une cascade de réactions enzymatiques. Dans cette chaîne métabolique, une enzyme agit sur un substrat spécifique et le transforme en un nouveau produit, qui devient le substrat d'une nouvelle enzyme et ainsi de suite.

Il a été montré que la production des aflatoxines commence à partir de l'acétyl-CoA, suivant la voie proposée par Birch en 1967 (Birch, 1967) et qu'au moins 27 réactions enzymatiques sont impliquées dans ce processus (Roze et al., 2015).

La biosynthèse des aflatoxines est considérée comme l'un des processus de formation de métabolites secondaires naturels les plus complexes, car elle implique un grand nombre de réarrangements oxydatifs (Minto & Townsend, 1997).

Un groupe important d'enzymes impliquées dans ces réarrangements oxydatifs sont des oxygénases, qui permettent l'incorporation d'oxygène moléculaire dans leurs substrats. Elles sont impliquées dans la cascade enzymatique de la biosynthèse des aflatoxines et sont divisées en deux classes (Dutton, 1988) :

- Monoxygénases : elles incorporent un des atomes de l'oxygène moléculaire et l'autre atome est réduit par le NADPH.
- Dioxygénases : elles incorporent les deux atomes d'oxygène et peuvent ou non cliver le cycle.

Un autre type important de réaction oxydative que l'on retrouve dans la biosynthèse des aflatoxines est la réaction de Baeyer-Villiger (BV), dans laquelle un atome d'oxygène est inséré entre deux carbones.

Pour illustrer son importance, le système le plus important de détoxification et de synthèse des aflatoxines ; le cytochrome P-450 est formé par une monooxygénase contenant le groupe prosthétique de l'hème. Ces enzymes (cytochrome P-450) sont impliquées dans la liaison des groupes fonctionnels (méthyle, acétyle) au cours de la biosynthèse (Nelson, 2011), et sont largement synthétisées par le cluster de gènes des aflatoxines.

La figure 5 montre les principales réactions enzymatiques, les intermédiaires qui sont produits lors de la synthèse d'AFB1 et les gènes codants pour les enzymes impliquées dans chaque étape de la biosynthèse.

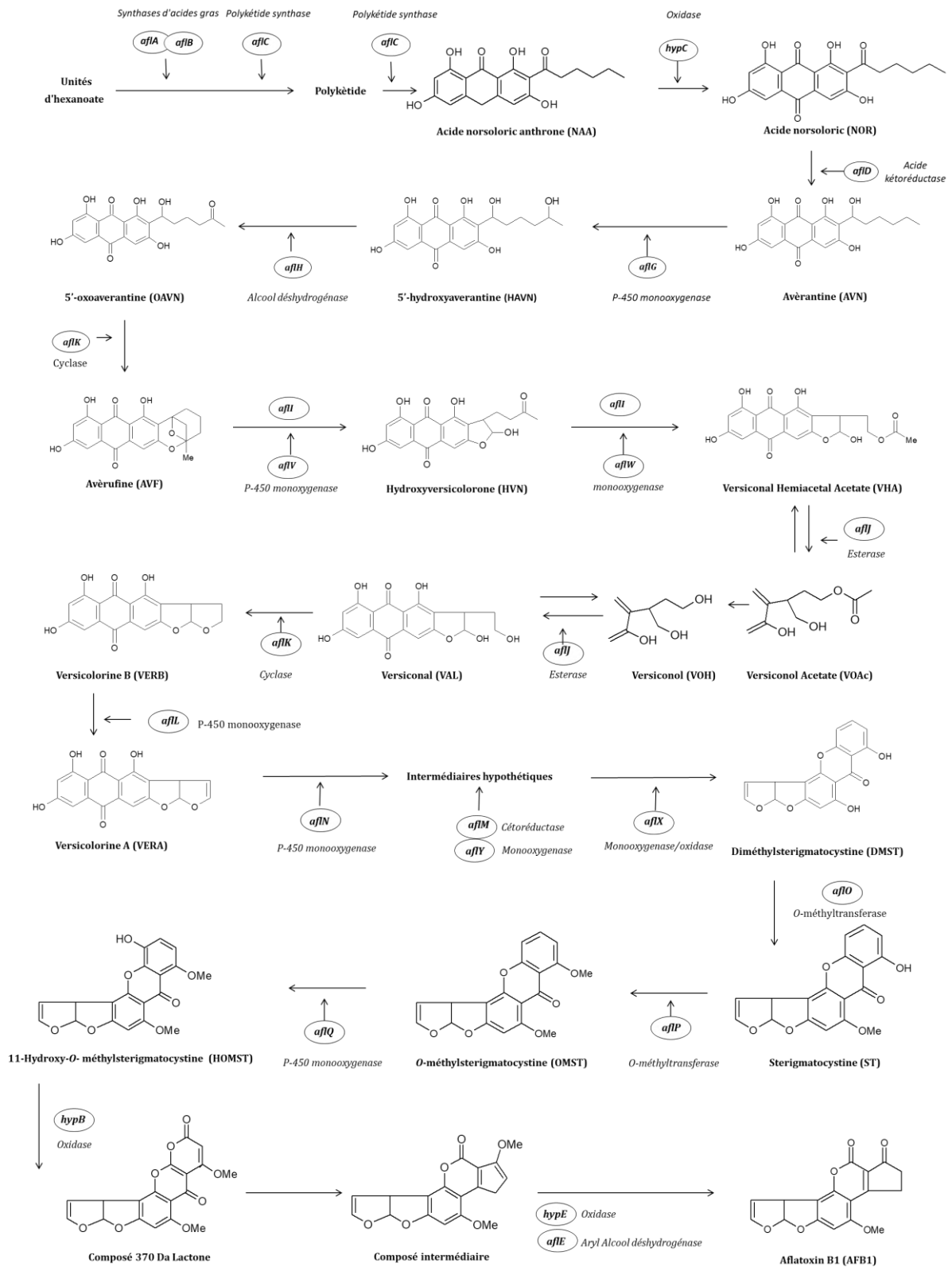


Figure 5. Cascade enzymatique conduisant à la synthèse de l'AFB1 et niveau d'intervention des gènes du cluster codant pour les enzymes impliquées (Caceres et al., 2020).

I.2.3.3 Régulation

I.2.3.3.1 Gènes régulateurs internes *aflR* et *aflS*

- Le facteur de transcription AflR

Le principal gène régulateur de la voie de biosynthèse des aflatoxines chez *A. flavus* et *A. parasiticus* et de la sterigmatocystine chez *A. nidulans* est le gène *aflR* (Price et al., 2006; J.-H. Yu & Keller, 2005). Le gène *aflR* code pour un facteur de transcription du cluster Zn (II) de la famille de type Gal4, appelé AflR (Shimizu et al., 2003).

Chez *A. flavus*, la protéine AflR conduit à la production des AF, car elle se lie à au moins 17 gènes du cluster, ce qui entraîne l'activation de la cascade enzymatique (Ehrlich, 2009). Elle se lie aux régions promotrices des gènes du cluster pour initier leur transcription. Ce type de facteur de transcription possède une structure spécifique qui n'est attribuée qu'au règne fongique. Ils sont capables de se lier à l'ADN via un "DNA-binding domain" (DBD), qui est l'un des éléments les plus importants dans les processus de transcription et de traduction (MacPherson et al., 2006). Ce processus se produit dans le noyau, où les parties à doigt de zinc de la protéine AflR se lient à l'ADN (Caceres et al., 2020).

aflR agit comme un régulateur positif du cluster. Ainsi, chez *A. flavus*, une surexpression d'*aflR* peut réguler positivement l'expression des gènes du cluster, entraînant une production d'aflatoxines jusqu'à 50 fois plus importante (Flaherty & Payne, 1997). Inversement, la délétion d'*aflR* dans une souche d'*A. parasiticus* accumulant la O-méthylsterigmatocystine (OMST) a eu un effet négatif sur l'expression des gènes de la voie de biosynthèse et donc sur la production d'OMST (Cary et al., 2000).

- Le facteur de transcription AflS

AflS est une protéine fongique qui peut interagir avec AflR en agissant comme son coactivateur. La délétion de *aflS* génère des mutants ayant une capacité d'expression réduite de certains gènes du cluster de biosynthèse de l'AFB1 (*aflC*, *aflD*, *aflM* et *aflP*) (Chang, 2003). En revanche, la surexpression de ce gène a entraîné des niveaux plus élevés de production d'AFB1 avec une augmentation de 4 à 5 fois des niveaux d'expression de *aflC* et *aflD* (Du et al., 2007).

S'il est vrai que le processus de régulation de la biosynthèse des aflatoxines n'est pas encore clairement compris, il est certain que l'interaction entre les protéines AflR et AflS est nécessaire pour que la régulation du cluster ait lieu.

Une étude propose la formation d'un complexe AfIR/AfIS, où 4 protéines AfIS sont associées à 1 protéine AfIR, facilitant la liaison de AfIR au niveau des régions promotrices des gènes du cluster et l'induction de leur transcription (Kong et al., 2014).

I.2.3.3.2 Régulateurs externes : rôle majeur du stress oxydatif

Les aflatoxines étant des métabolites secondaires, leur production est étroitement dépendante de l'environnement dans lequel se trouve la souche fongique toxigène. Ces dernières années, de nombreuses études ont été menées pour comprendre comment ces facteurs environnementaux (nutriments, activité de l'eau, pH, température et activité de l'eau) interagissaient avec la voie de biosynthèse de ces toxines (Caceres et al., 2020; Fountain et al., 2016; J. Liu et al., 2016; Medina et al., 2014; J.-H. Yu & Keller, 2005).

Il apparaît que, parmi ces différents facteurs environnementaux, le stress oxydatif est l'un des facteurs les plus importants dans la régulation de la biosynthèse des aflatoxines (F. Tian et al., 2021). En fait, le stress oxydatif est si important qu'il a été proposé que, chez *A. flavus* et *A. parasiticus*, la production d'aflatoxines fasse partie intégrante de la réponse fongique au stress oxydatif et que ce dernier soit donc un facteur clé de sa production (Hong, Roze, Wee, et al., 2013; Roze et al., 2015).

Le stress oxydatif chez les champignons est causé par des espèces réactives de l'oxygène (ROS), qui sont produites naturellement par le champignon au cours de son développement. Cependant, les niveaux de ROS peuvent être modifiés par des changements dans les conditions environnementales (Hong, Roze, Wee, et al., 2013).

La présence de ROS tels que l'oxygène singulet (1O_2), le superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^{\cdot}) dans les cellules peut entraîner des dommages oxydatifs aux protéines (inactivation), à l'ADN et aux lipides (peroxydation) (Hong, Roze, & Linz, 2013; Montibus et al., 2015).

Pour se protéger de cette toxicité, les champignons expriment plusieurs facteurs de transcription (TF) qui vont activer des systèmes de défense enzymatique capables de protéger les cellules contre des niveaux excessifs de ROS (Hong, Roze, & Linz, 2013; Montibus et al., 2015).

Ces défenses comprennent des enzymes antioxydantes telles que les catalases (CAT), les superoxyde dismutase (SOD) et la glutathion peroxydase (GPX) (Gessler et al., 2007) (par exemple, les multiples monooxygénases du cytochrome p450 mentionnées dans la

section 2.2) sont des enzymes clés de la défense fongique contre les ROS, qui servent de médiateur à la défense cellulaire contre le stress oxydatif. La SOD agit comme une première ligne de défense en catalysant la transformation du superoxyde en peroxyde d'hydrogène, puis les peroxydases et les catalases transforment le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène (Figure 6) (Hong, Roze, & Linz, 2013).

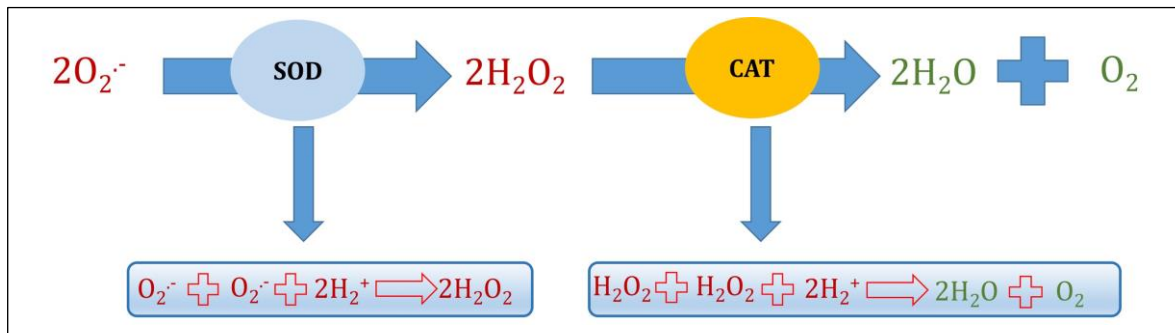


Figure 6. Réactions catalysées par des enzymes antioxydantes (SOD et CAT) pour détoxifier les ROS

La figure 7 montre un schéma général des facteurs qui génèrent la production de ROS ainsi que les facteurs de transcription responsables de la génération des enzymes capables de réduire les ROS et d'activer la production d'AFB1.

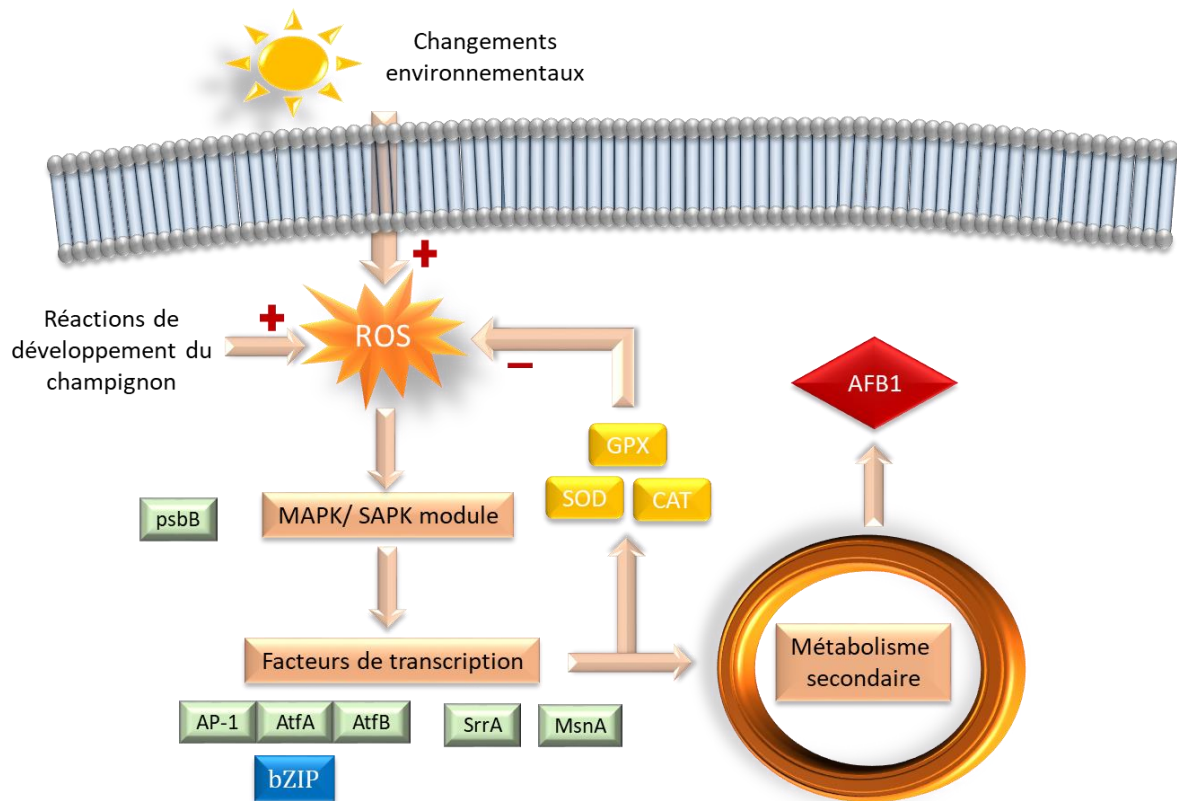


Figure 7. Schéma représentant la réponse globale de *A. flavus* au stress oxydatif et le lien possible avec la production d'aflatoxines. Source personnelle

Nous pouvons conclure que la biosynthèse de l'AFB1 est activée par des facteurs induisant un stress oxydatif. Par conséquent, une option intéressante pour supprimer la production d'AFB1 est l'utilisation de composés antioxydants. Certaines molécules antioxydantes telles que les tannins hydrolysables (acide gallique) inhibent significativement la biosynthèse des aflatoxines (Mahoney & Molyneux, 2004). Certains composés phénoliques antioxydants, tels que l'acide ascorbique diminuent les ROS et, en parallèle, significativement la production d'aflatoxines, sans affecter la croissance du champignon (J. H. Kim et al., 2006). L'acide caféique est une autre molécule antioxydante qui a montré un effet inhibiteur sur l'aflatoxigénèse (Bok & Keller, 2004).

I.3 Moyens de lutte contre les aflatoxines

I.3.1 Niveau d'intervention

La contamination par les aflatoxines peut survenir à n'importe quel stade de la chaîne alimentaire humaine ou animale. Elles peuvent apparaître à des étapes précoces (au moment du semis) ou tardifs (en stockage) et contaminer ainsi avant la consommation une grande variété de produits alimentaires (Sipos et al., 2021).

De manière générale, la lutte contre la production d'aflatoxines peut être séparée en trois niveaux d'action : la prévention, la décontamination et la détoxification (tableau 6).

Tableau 6. Stratégies possibles pour lutter contre la contamination par les aflatoxines (modifié à partir de (Sipos et al., 2021))

Niveau 1	Niveau 2	Niveau 3
Prévention	Décontamination	Détoxification
Contrôle biologique sur le terrain	Suppression	Ionisation
Bonnes pratiques agricoles	Tri sélectif	Traitements thermiques et sous pression
Bonnes pratiques de stockage	Adsorption	Traitements plasma non thermiques
Bonnes pratiques de fabrication	Filtration	Agents chimiques

La prévention est le premier et le plus important niveau de lutte contre les aflatoxines. Toutes les stratégies visant à empêcher la production de ces métabolites toxiques sont indispensables, en raison des grandes difficultés d'élimination des aflatoxines une fois présentes dans le produit à cause de la grande stabilité de ces molécules. La décontamination et la détoxification sont plus difficiles à mettre en œuvre et souvent peu efficaces. Néanmoins, ces stratégies peuvent être nécessaires ou intéressantes si les techniques mises en œuvre dans le cadre de la prévention échouent.

Il existe de nombreuses revues sur la décontamination et la détoxification (Ismail et al., 2018; Luo et al., 2018; Sipos et al., 2021). Dans ce travail nous nous concentrerons sur le premier niveau : la prévention.

La prévention peut intervenir aux trois points de la chaîne de production : avant la récolte, en période péri-récolte (bonnes pratiques agricoles) où après la récolte (bonnes pratiques de fabrication).

I.3.2 Méthodes conventionnelles de lutte contre la contamination par les aflatoxines

I.3.2.1 Bonnes pratiques agricoles

La contamination par l'AFB1 commence généralement dans le champ et en période péri-récolte. Puis, si la manipulation post-récolte est mauvaise, les concentrations d'aflatoxines peuvent augmenter considérablement pendant le stockage (Moral et al., 2020). Pour cette raison, le premier point critique pour éviter le développement d'*A. flavus* et la synthèse d'AFB1, est d'adopter de bonnes pratiques agricoles afin d'établir un environnement défavorable à la croissance des spores fongiques qui peuvent être présentes dans le sol.

I.3.2.1.1 Au champ

En général, les pratiques au champ comprennent (Torres et al., 2014; Waliyar et al., 2013):

- Le labour du sol avant semis
- Le désherbage
- Le respect de la période de plantation spécifique à chaque type de culture et du moment optimal pour la récolte
- La fertilisation et gestion du sol
- La gestion préventive des infestations d'insectes
- L'irrigation
- La bonne gestion des résidus de culture qui sont souvent l'inoculum primaire des champignons mycotoxigènes
- La rotation des cultures avec des cultures moins sensibles au développement d'*A. flavus*

Il a été démontré que la maîtrise de certaines pratiques de gestion des champs, telles que la rotation des cultures, le labour, l'irrigation et la fertilisation permet de réduire la formation de mycotoxines au champ (Ariño et al., 2009; Kabak et al., 2006).

I.3.2.1.2 Période péri-récolte

La période péri-récolte joue également un rôle essentiel dans la prévention de la contamination mycotoxique car il a été démontré qu'une sélection minutieuse de la date et des procédures de récolte permet de réduire le risque mycotoxique et de minimiser les dommages aux cultures (Murphy et al., 2006). De même, il faut éviter autant que possible les dommages mécaniques pendant la récolte, qui rendent les grains plus vulnérables aux infections fongiques ultérieures ainsi qu'aux infestations d'insectes (Diao et al., 2014).

Les blessures causées par les attaques d'insectes peuvent également favoriser une contamination par les aflatoxines, comme cela a été démontré pour le maïs (Torres et al., 2014). Le champignon peut alors se développer à l'intérieur des grains et est donc en contact direct avec les nutriments.

Selon le produit, les pratiques de récolte et la gestion de cette période clé varient et doivent être adaptées pour obtenir une plus grande efficacité contre la production d'aflatoxines. Par exemple, dans le cas du maïs, il est recommandé de récolter les épis sur leurs feuilles et de veiller à ce que les feuilles ne soient pas endommagées, car elles jouent un rôle essentiel dans la protection des épis contre les insectes tels que les charançons. Ces insectes augmentent non seulement la surface susceptible d'être infectée par des champignons, mais peuvent également humidifier les grains par leur propre activité métabolique et ainsi favoriser la croissance des champignons (Udoh et al., 2000).

Au contraire, dans le cas des arachides, il a été démontré que lorsque l'élimination des gousses est retardée, la teneur en toxines dans les amandes d'arachide augmente considérablement et plus l'élimination est retardée, plus la teneur en toxines continue d'augmenter (Waliyar et al., 2008).

Une autre variable importante à prendre en compte dans le cas des arachides et du maïs est le type de séchage, car il a été démontré que le séchage traditionnel, en tas, maintient l'humidité en raison d'une mauvaise aération et favorise la prolifération des champignons et l'accumulation des toxines. Inversement, le séchage de faibles épaisseurs de produits

étalées au soleil et avec une meilleure aération réduit les niveaux d'aflatoxines (Waliyar et al., 2008).

Les bonnes pratiques agricoles au champ et pendant la récolte sont donc essentielles pour limiter la contamination fongique et la production d'aflatoxines. Cependant, les conditions post-récolte (stockage et distribution) constituent aussi un point critique pour limiter la croissance fongique et éviter la production de toxines pendant cette période. En effet, si *A. flavus* contamine les cultures dans les champs, il peut se développer rapidement pendant le stockage et produire des quantités importantes d'aflatoxines si les conditions sont favorables (Torres et al., 2014).

I.3.2.1.3 Stockage

Certains auteurs proposent que la contamination par les aflatoxines se produit plus pendant la période post-récolte que lors de la pré-récolte (Waliyar et al., 2013). Il a même été suggéré que les épidémies d'aflatoxicose au Kenya en 2004 et 2005 étaient dues à une contamination post-récolte (Amaike & Keller, 2011).

Dans les pays en développement, la plupart des producteurs ne disposent pas de conditions adéquates pour le stockage des grains. Par exemple, en Afrique de l'Ouest, les conditions de stockage disponibles dans les fermes et chez les petits agriculteurs sont souvent inadéquates ; il y a un manque de conteneurs de stockage propres et de fréquentes infestations de parasites. Ces problèmes créent des conditions propices à l'accumulation d'aflatoxines, même dans des produits qui n'étaient pas contaminés au moment de la récolte. Il a été démontré que la teneur en aflatoxine pouvait être multipliée par trois deux mois après le début du stockage (Waliyar et al., 2008).

Pour limiter le risque de contamination par les aflatoxines, le stockage et la distribution des grains secs doivent se faire dans un endroit propre, à température modérée et à humidité contrôlée (moins de 15%, avec une activité de l'eau des grains $a_w < 0,70$), à l'abri des insectes nuisibles. Il faut également éviter la ré-humidification pendant le stockage. La ré-humidification peut résulter de toits non étanches des salles de stockage, d'une mauvaise ventilation des silos entraînant une condensation de l'eau, ou d'une humidité initiale des grains trop élevée avant le stockage (Kabak et al., 2006; Torres et al., 2014).

Cependant, même après avoir appliqué correctement toutes les recommandations de gestion avant, pendant et après la récolte, la contamination par les aflatoxines n'est pas

toujours complètement évitée. C'est pourquoi ces pratiques sont généralement utilisées en conjonction avec d'autres méthodes pour obtenir une efficacité maximale dans l'inhibition de la production d'aflatoxines.

I.3.2.2 Produits phytosanitaires

L'une de ces stratégies, couramment utilisée en conjonction avec les bonnes pratiques agricoles pour lutter contre différents agents pathogènes agricoles, est l'utilisation de pesticides (fongicides et insecticides). Son efficacité a été démontrée, ce qui a conduit à son utilisation massive depuis plusieurs décennies. Cependant, cette stratégie perd aujourd'hui de sa pertinence pour de multiples raisons. La raison principale est la prise de conscience de l'impact environnemental de ces produits. Par exemple, les insecticides ont un effet démontré sur de nombreuses espèces d'insectes, y compris non cibles. De même, les herbicides impactent la biodiversité végétale. En parallèle, il a été noté une perte d'efficacité progressive de ces composés à cause de l'émergence de résistances chez les différents organismes cibles.

I.3.2.2.1 Les fongicides

Dans les années 1990, la question de l'efficacité de ces fongicides pour limiter la contamination mycotoxique a été posée en raison d'informations contradictoires disponibles. Par exemple, l'iprodione qui est un dicarboximide agissant sur les oxydases, est capable de bloquer la formation de versicolorine et donc la voie de biosynthèse des aflatoxines dans deux souches mutantes de *A. parasiticus* (Hasan, 1999).

De même, la clobentiazone, un benzonitrile, s'est révélée efficace pour bloquer la production d'AFB1 *in vitro* chez *A. flavus*. Cependant, l'effet inverse a été observé chez *A. parasiticus* où la synthèse des aflatoxines a été stimulée par ce composé (Wheeler et al., 1991). Des tests de laboratoire ont également montré qu'*A. parasiticus* produisait plus d'aflatoxines après des traitements avec les fongicides miconazole et fenpropimorph (Felix D'Mello et al., 1998).

Même si les fongicides sont souvent encore considérés comme essentiels pour maintenir des cultures saines avec une bonne productivité (Brent y Hollomon, 2007), leur usage commence à être sérieusement questionné, particulièrement en raison de leur toxicité et des résistances qu'ils génèrent.

- Toxicité

S'il est vrai que de nombreux produits chimiques utilisés comme fongicides sont inoffensifs à faible dose, lorsque leur utilisation est inappropriée ou dépasse les normes recommandées, ils peuvent facilement devenir toxiques et oncogènes (Blair, 1989). Les effets les plus courants des fongicides lors d'exposition professionnelle sont la dermatite allergique et l'irritation de la peau et des muqueuses (Schneider & Dickert, 1994). Cependant, une exposition prolongée pourrait aussi avoir des conséquences néfastes plus graves et, en particulier, des effets cancérigènes et/ou mutagènes. En outre, la présence de résidus et de produits de dégradation de fongicides dans le sérum, l'urine et le tissu adipeux d'hommes non impliqués dans des opérations agricoles montre la fréquence de l'exposition indirecte à ces composés, par l'alimentation (Blair, 1989).

- Résistance

Une autre limitation croissante à l'utilisation des fongicides est liée à l'émergence progressive de résistances chez les organismes cibles. Par exemple, une étude menée pendant trois ans dans le Mississippi (États-Unis) a montré qu'aucun des cinq types de fongicides appliqués (azoxystrobine, pyraclostrobine, propiconazole, tétraconazole et dithiocarbamate) ou des mélanges de trifloxystrobine et de propiconazole ou d'azoxystrobine et de propiconazole n'ont permis de réduire de manière significative la contamination par les aflatoxines observées dans les champs de maïs (H. Abbas et al., 2009).

Un autre exemple est la résistance développée par le champignon *Fusarium graminearum* à la famille des fongicides azotés, principalement au tébuconazole (10,9 fois plus résistant en l'espace de 33 jours) mais aussi à d'autres molécules dans une moindre mesure (e.g. fénarimol, triadimenol, imazalil, flusilazole, penconazole et prochloraz) (Becher et al., 2010). Cette étude a été confirmée par Popiel et al. Lorsque plusieurs isolats de *F. graminearum* et *F. culmorum* ont présenté une résistance au flusilazole (un fongicide triazolé) (Popiel et al., 2017).

De plus, il existe un problème peut-être encore plus important que l'émergence de résistances des champignons aux fongicides. En effet, de nombreux auteurs ont montré que, lorsque les champignons sont confrontés à des quantités non létales de fongicides, la réaction fongique entraîne une augmentation de la biosynthèse et de la libération de mycotoxines (Ochiai et al., 2007; Popiel et al., 2017; Schmidt-Heydt et al., 2013). Bien que

le mécanisme par lequel le champignon augmente sa capacité aflatoxinogène n'ait pas encore été élucidé, il est suggéré que cela pourrait être dû à une mutation causée par le stress et la présence excessive de ROS (Popiel et al., 2017).

En Europe, des mesures et des limitations ont été prises concernant l'utilisation de ces composés au profit de cultures plus biologiques et durables. En France, le plan Ecophyto 2018 visait à réduire de 50 % l'utilisation des pesticides dans l'agriculture en 2018. Cependant, cet objectif est loin d'avoir été atteint et, dans le plan Ecophyto 2, de nouveaux projets sont évalués pour atteindre ces objectifs à l'horizon 2025.

I.3.2.2.2 Les insecticides

Les infestations d'insectes dans les cultures céréalières sont courantes, et en ce qui concerne les aflatoxines, elle est problématique pour deux raisons. La première est que les insectes propagent les spores de différentes espèces de champignons toxigènes tels que *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* et *Aspergillus* (Khan et al., 2016). De plus, comme déjà mentionné, les insectes peuvent endommager la structure des grains, provoquant des conditions favorables à la colonisation de champignons tels que *A. flavus* qui peuvent produire ensuite des aflatoxines. Par conséquent, il est important de limiter la présence d'insectes nuisibles sur les cultures pour diminuer la contamination par les aflatoxines. Le tableau 7 présente les principaux insecticides et leur effet sur les insectes aquatiques et terrestres.

Tableau 7. Principaux insecticides et leurs actions cibles (Sanchez-Bayo, 2014)

Cible	Classe d'insecticide
Neurotoxique	Carbamates
	Organophosphore
	Avermectine
	Cyclodiène OC
	Neonicotinoides,
	spiosad
	Dithioles
	Pyrethroïdes
Indoxacarb	

	Amitraz
Inhibiteurs de la respiration cellulaire	Organométalliques
	Propargite
	Fumigants
Inhibiteurs de croissance	Benzoylureas
	Cyromazine
	Buprofezine
	Agoniste d'ecdysone
	Hormones juvéniles
	Cristaux de <i>Bacillus thuringiensis</i>
Atteintes stomacales	Sulcofuron
	Cryolite
Autres cibles	Phéromones

L'un des principaux facteurs qui rendent la lutte contre les insectes difficile est la résistance des ravageurs aux insecticides, c'est pourquoi il est nécessaire de créer continuellement de nouvelles préparations.

Par exemple, certains ravageurs résistants sont apparus entre 2 et 20 ans après l'introduction de nouveaux insecticides : carbamates, organophosphorés, pyréthroïdes (Oberemok et al., 2015).

La toxicité des insecticides est similaire à celle des fongicides. Ces composés peuvent induire un stress oxydatif au niveau cellulaire. Ce dernier se définit par un déséquilibre entre les radicaux libres et les défenses anti-oxydantes de l'organisme, ce qui entraîne la peroxydation des lipides membranaires. Ceci peut entraîner, chez l'homme des lésions dans de nombreux tissus (nerveux, hépatique et rénal) (Ansari et al., 2014; Sanchez-Bayo, 2014).

Il semble donc important de trouver des alternatives à l'utilisation de pesticides pour contrôler la croissance fongique et la contamination mycotoxique afin de garantir la

sécurité des aliments et développer des pratiques agricoles durables et plus respectueuses de l'environnement.

I.3.3 Méthodes alternatives

I.3.3.1 Stratégies de bio-contrôle

Un moyen permettant de remplacer l'utilisation de fongicides et de réduire la contamination des cultures par les aflatoxines est le recours au biocontrôle. Le biocontrôle consiste en l'utilisation de microorganismes naturels ou modifiés pour réduire la croissance ou les effets des organismes indésirables, tout en favorisant le développement de microorganismes bénéfiques pour les plantes.

I.3.3.1.1 Utilisation de souches atoxinogènes

Comme tous les champignons, *A. flavus* peut être classé en différents groupes de compatibilité végétative (VCG), selon le type de mutation qu'ils présentent (capacité à produire certaines toxines et des sclérotés) (Chang et al., 2005). Certains VCG sont composés de souches atoxigènes et ces groupes génétiques sont de bons candidats pour les produits de biocontrôle. Le principe est alors d'utiliser ces souches comme compétiteurs des souches toxigènes.

La sélection de souches atoxigènes d'*A. flavus* destinées à être utilisées comme agents de lutte biologique est un processus complexe qui doit suivre une série d'étapes bien établies :

- Sélection d'isolats natifs et bien adaptés
- Détermination des raisons de leur incapacité à produire des aflatoxines
- Evaluation de leur capacité à concurrencer les producteurs d'aflatoxines dans des conditions contrôlées sur le terrain (Agbetiameh et al., 2019). En effet, sur le terrain, les souches atoxigènes utilisées en lutte biologique entrent en compétition avec les souches toxigènes et doivent les dominer pour en limiter la croissance. Elles limitent ainsi l'infection des grains par des souches toxigènes autochtones (Torres et al., 2014).

L'utilisation d'isolats atoxigènes d'*A. flavus* comme ingrédient actif dans des formulations de lutte biologique est une technologie sûre, peu coûteuse, facile à utiliser et efficace pour protéger les cultures de la contamination par les aflatoxines, à condition qu'elle soit

toujours utilisée en combinaison avec des bonnes pratiques de contrôle et de gestion post- et pré-récolte (Moral et al., 2020).

Le premier produit de lutte biologique à être approuvé par l'Agence américaine de protection de l'environnement (USEPA) était constitué par la souche ATCC 96045 ou AF36®. Il a été mis au point par le Service de recherche agricole du ministère de l'Agriculture des États-Unis (USDA - ARS) et contient comme ingrédient actif un isolat atoxigène provenant de graines de coton, originaire de Yuma, en Arizona (États-Unis) (Brown et al., 1991; Cotty, 1990). L'AF36 a été initialement homologué pour être utilisé dans les champs de coton en Arizona et en Californie, puis l'homologation a été étendue pour traiter le maïs en Arizona et au Texas. L'AF36 est produit et distribué par l'Arizona Cotton Protection and Research Council (Cotty et al., 2007) et est actuellement utilisé dans plusieurs États américains, ce qui en fait le produit de lutte biologique contre les aflatoxines le plus utilisé au monde (Moral et al., 2020).

Cependant, si la souche AF36 ne produit pas d'aflatoxines, elle produit toujours de l'Acide cyclopiazonique (ACP), un métabolite secondaire toxique, produit dans les mêmes conditions environnementales que l'AFB1. Par conséquent, lorsque les cultures sont inoculées avec cette souche, il peut y avoir une accumulation de cette molécule (H. Abbas et al., 2011; Ehrlich, 2014).

Un autre produit de lutte biologique commercialisé est l'Afla-Guard®, qui contient comme ingrédient actif un isolat atoxigène différent de *A. flavus* : la souche NRRL21882. Cette souche a été isolée d'arachides dans l'État de Géorgie aux États-Unis et enregistrée auprès de l'USEPA pour une utilisation sur le maïs et les arachides aux États-Unis (Chang et al., 2005; Dorner, 2009). Il est commercialisé par Syngenta Crop Protection, Inc. (Greensboro, NC, USA) et a été utilisé dans des champs expérimentaux d'arachides en Turquie (Lavkor et al., 2019). Son utilisation a permis de réduire les populations aflatoxinogènes dans le sol de ces cultures de 71% avant traitement à 4% après application. Cette réduction est accompagnée d'une réduction significative du niveau de contamination par les aflatoxines (Dorner, 2009; Dorner & Lamb, 2006).

La souche K49, également utilisée pour la lutte biologique, appartient au même VCG que la souche AF36 et a été isolée de cultures de maïs dans le Mississippi (H. Abbas et al., 2011). Cependant, elle ne produit pas d'ACP (Chang et al., 2012). Elle est principalement

utilisée sur les cultures de maïs où elle s'est avéré efficace pour réduire les niveaux d'aflatoxines (H. K. Abbas et al., 2006).

Enfin, il existe la famille de produits Aflasafe®, utilisée pour réduire efficacement la teneur en aflatoxines des cultures (Bandyopadhyay et al., 2016, 2019). Chaque produit Aflasafe® contient, comme principe actif, quatre souches atoxigènes différentes appartenant à différents VCG natifs du pays cible et plusieurs d'entre eux sont actuellement commercialisés dans différents pays africains (Schreurs et al., 2019). Au Nigeria, au Kenya, au Sénégal, en Zambie et au Burkina Faso, la formulation d'Aflasafe® a été adaptée avec 4 souches non toxigènes originaires de chacun de ces pays (Hell & Mutegi, 2011; Odhiambo, 2014). Cette dernière approche a été développée car il a été observé que, dans les conditions naturelles, la prédominance d'un seul VCG d'*A. flavus* dans une zone est transitoire et que, après quelques années, elle perd son efficacité (Ortega-Beltran & Cotty, 2017). Par conséquent, l'utilisation de plusieurs isolats pourrait augmenter les chances de promouvoir des communautés atoxigènes diverses à long terme.

Cette approche, très séduisante et efficace à court terme, présente cependant une limite majeure. En effet, *A. flavus* est capable de se reproduire sexuellement dans certaines conditions et donc, d'échanger son matériel génétique par recombinaison entre souches. Ces échanges de matériel génétique pourrait aboutir à une récupération du pouvoir toxigène des souches de biocontrôle (Olarte et al., 2012). Par conséquent, l'utilisation de ces souches et leur efficacité à long terme méritent une évaluation plus approfondie.

I.3.3.1.2 Utilisation de bactéries

Une autre stratégie de biocontrôle repose sur l'utilisation de bactéries, qui peuvent interférer à différents niveaux avec le métabolisme fongique : inhiber le développement du champignon, inhiber spécifiquement la production d'AFB1 ou la dégradation, détoxification ou l'adsorption des aflatoxines, après leur production.

L'effet fongistatique des bactéries repose généralement sur la capacité à produire des composés qui inhibent la croissance du champignon, tels que les acides organiques (acides lactique, propionique et acétique) (Ross et al., 2002) ou d'autres composés tels que la reutérine (Sadeghi et al., 2019). De plus, certaines protéines produites par des bactéries peuvent également avoir un effet fongicide (Chen et al., 2018).

D'autre part, les bactéries capables d'inhiber la production d'aflatoxines sans provoquer une inhibition significative de la croissance du champignon sont des bactéries ubiquitaires reconnues comme non pathogènes et ne sécrétant pas de métabolites toxiques. Elles appartiennent essentiellement à 4 genres : *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas* et *Streptomyces* et sont présentées ci-dessous (Schallmey et al., 2004).

- *Bacillus spp.*

Bacillus spp. est un groupe multifonctionnel de bactéries connues pour leur production de molécules bioactives (enzymes, antibiotiques et métabolites) utilisées dans les secteurs médical, pharmaceutique et agricole (Celandroni et al., 2019). C'est le genre de micro-organismes le plus étudié pour le biocontrôle des champignons aflatoxigènes car ils se développent rapidement et sont considérés comme "GRAS" ou généralement reconnus comme des bactéries sûres (Schallmey et al., 2004).

Bacillus megaterium et *B. subtilis* ont montré l'activité de lutte biologique la plus élevée, inhibant la croissance et la production d'aflatoxines par les souches aflatoxigènes, avec une capacité à inhiber la production d'AFB1 par *A. flavus* en milieu PDA à 98%. Cet effet est lié à une diminution de l'expression de 6 gènes appartenant au groupe AFB1 (*aflF*, *aflT*, *aflS*, *aflJ*, *aflL*, *aflX*) dont le régulateur interne *aflS* (Kong et al., 2014). *B. subtilis* a également été capable d'inhiber la croissance d'*A. parasiticus* et la production d'aflatoxines jusqu'à 92 % et 100 %, respectivement (Siahmoshteh et al., 2018). Une co-culture avec *B. subtilis* et *B. amyloliquefaciens* conduit à une inhibition presque complète de la production d'AFB1 par *A. parasiticus* (Siahmoshteh et al., 2017). D'autre part, il a également été démontré que *B. pumilus* a la capacité d'inhiber la production d'AFB1. Il a aussi été montré que des extraits de 6 souches de *B. pumilus* ont inhibé la production d'AFB1 chez *A. parasiticus* par le biais de métabolites bactériens non identifiés (Celestin Munimbazi & Lloyd B. Bullerman, 1998).

- *Pseudomonas spp.*

Le genre *Pseudomonas* comprend 191 espèces, capables de coloniser une variété de niches écologiques et c'est l'un des genres les plus fréquemment isolés du sol (plantes rhizosphériques ou non rhizosphériques). Diverses souches ont été testées pour leur effet anti-aflatoxinogène et il a été constaté que *P. fluorescens* pouvait réduire la production

d'AFB1 par *A. flavus* en milieu arachide à un taux de 99,4% (Yanget al., 2017) ainsi qu'inhiber la germination des conidies d'*A. flavus* autour de 20 % (Akocak et al, 2015). Des souches chitinolytiques de *P. chlororaphis* isolées de champs de maïs et de rhizosphères de maïs se sont révélées capables d'inhiber complètement la croissance d'*A. flavus* (Palumbo et al., 2007). La souche AS15 de *P. protogens* a démontré une inhibition de 83 % de la production d'AFB1 par *A. flavus* dans le riz et une inhibition de 68 % de la croissance mycélienne (Mannaa et al., 2017 ; Palumbo et al., 2006).

- *Lactobacillus spp.*

Les *Lactobacilles* sont des bactéries qui produisent des acides organiques, principalement de l'acide lactique, par fermentation des glucides. Dans la production alimentaire, ces bactéries sont traditionnellement utilisées pour prévenir la détérioration et augmenter la durée de conservation des aliments. *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. pentosus*, *L. paraplantarum* et *L. delbrueckii* subsp. *lactis* ont été identifiés comme agents de lutte biologique contre les champignons aflatoxigènes.

Comme rapporté par Sangmanee et Hongpattarakere en 2014, le surnageant obtenu à partir du bouillon de culture de *L. plantarum* peut inhiber la croissance mycélienne et la production d'aflatoxine d'*A. flavus* de 100 %, se révélant être l'espèce de *Lactobacillus* la plus importante dans la lutte contre la contamination d'AFB1 (Sangmanee et Hongpattarakere, 2014).

D'autres études ont montré que l'espèce *L. delbrueckii* subsp. *lactis*, module négativement l'expression du gène régulateur interne *aflR* du groupe AFB1 chez *A. parasiticus*, ce qui entraîne une diminution de la production de la toxine et une modulation importante de la croissance, de plus, il inhibe complètement la production d'AFG2 (Ghanbari et al., 2017). Il a également été montré que *L. casei*, *L. fermentum*, *L. reuteri* et *L. acidophilus* ont un effet inhibiteur supérieur à 80% sur *Aspergillus niger*, *Penicillium sp.* et *Fusarium graminearum* (Gerez et al., 2013).

Enfin, concernant la détoxification des aflatoxines, il a été montré que certaines souches de *Lactobacilles* montraient la capacité de se lier physiquement aux aflatoxines (Ahlberg et al, 2015).

- *Streptomyces spp.*

Les espèces du genre *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses Gram (+) qui poussent largement dans les sols et les plantes. Il a été démontré que la souche *Streptomyces* ASBV-1 pouvait réduire la viabilité des spores d'*A. parasiticus* et par la suite inhiber l'accumulation d'aflatoxines dans les amandes d'arachide (Zucchi et al., 2008). Dans leurs travaux, Verheecke et al. ont rapporté que plusieurs souches de *Streptomyces* isolées du sol avaient une forte bioactivité contre la production d'aflatoxine B1 et B2 par *A. flavus* (Verheecke, 2016 ; Verheecke et al., 2014).

De nombreuses autres espèces de *Streptomyces* ont été évaluées en tant qu'agents bioactifs fournissant une activité antifongique et antiaflatoxigène telles que *S. yanglinensis*, *S. anulatus*, *S. alboflavus* et *S. roseolus* (Ren et al., 2019).

I.3.3.2 Utilisation de composés naturels

Malgré l'existence des différentes stratégies de lutte mentionnées précédemment, la fréquence voire l'augmentation de la contamination des cultures par les aflatoxines montrent la nécessité de continuer à innover pour garantir la sécurité des aliments. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies pour compléter, renforcer et/ou remplacer les stratégies existantes.

Les plantes produisent divers composés bioactifs issus de leur métabolisme secondaire tels que des composés phénoliques, des terpènes, des stéroïdes et des alcaloïdes, qui ont différentes fonctions biochimiques et physiologiques (Tiwari & Rana, 2015). Ces composés appartiennent à des familles chimiques très diverses, avec des activités biologiques variées. En fait, déterminer la fonction exacte et univoque des métabolites secondaires dans les plantes est une tâche difficile (Loi et al., 2020).

Ces composés peuvent être impliqués dans la physiologie primaire de la cellule, agissant comme des facteurs de croissance végétale tels que l'éthylène, les auxines, les gibbérellines, l'acide abscissique, les cytokinines, les brassinostéroïdes et les polyamines, c'est-à-dire des hormones végétales (Depuydt et al., 2016). Cependant, leur principale fonction est écologique, notamment en ce qui concerne la défense des plantes contre les herbivores, les bactéries et les champignons (Mithöfer & Maffei, 2016).

Indépendamment de leur diversité, de leur fonctionnalité et de leur polyvalence, les métabolites secondaires des plantes sont largement étudiés et utilisés à différentes fins grâce à leurs différentes propriétés biologiques telles que des propriétés antioxydantes, antimicrobiennes, antifongiques, anticancéreuses... et d'autres qui restent à découvrir (Friedman & Rasooly, 2013; Jeff-Agboola & Awe, 2016; Newman & Cragg, 2020; Olugbenga et al., 2016).

Il a été démontré que certains composés bioactifs peuvent inhiber la croissance d'*Aspergillus* et/ou la production d'AFB1, même si, pour la plupart d'entre eux, le mécanisme d'action exact n'a pas été élucidé. Ces composés peuvent être contenus dans des huiles essentielles ou dans des extraits aqueux ou organiques, et leur effet antifongique ou antiaflatoxigène peut être le fait d'une ou plusieurs molécules.

Les molécules et extraits naturels présentant un effet fongicide ou antiaflatonogène sont répartis en trois classes : les huiles essentielles, les extraits de plantes et les molécules isolées.

I.3.3.2.1 Extraits de plantes

Les composés bioactifs de plantes peuvent être obtenus par différentes méthodes classiques (macération, extraction Soxhlet) et par des méthodes émergentes (ultrasons, micro-ondes, champs électriques, hautes pressions ou fluides supercritiques) pour améliorer les conditions d'extraction et sélectionner les différents composés d'intérêt. On peut aussi utiliser différents solvants, en fonction de leur affinité chimique (Loi et al., 2020). Quoiqu'il en soit, les remèdes traditionnels à base de plantes ou les plantes médicinales, souvent vendus sous forme séchée, sont généralement consommés après une simple infusion dans l'eau bouillante. Malgré leurs nombreuses vertus connues depuis l'époque des civilisations anciennes, ce n'est que au cours des dernières décennies que les études se sont intensifiées pour caractériser ces extraits aqueux et explorer leur potentiel antifongique ou antitoxinogène.

Comme mentionné précédemment, les plantes produisent des métabolites secondaires aux structures chimiques diverses (Tiwari & Rana, 2015). Cependant, certaines études mentionnent que les composés phénoliques (acides phénoliques, flavonoïdes et lignanes) et les composés azotés (glucosinolates et alcaloïdes) sont ceux qui ont la plus grande activité antifongique et antiaflatoxinogène (Loi et al., 2020). En outre, les extraits riches

en composés phénoliques présentent souvent une activité antioxydante élevée. Les tannins hydrolysables (acide gallique) inhibent significativement la biosynthèse des aflatoxines (Mahoney & Molyneux, 2004). L'acide ascorbique diminue les ROS, diminuant significativement la production d'aflatoxines, sans affecter la croissance du champignon (J. H. Kim et al., 2006). L'acide caféique est une autre molécule antioxydante qui a montré un effet inhibiteur sur l'aflatoxigénèse (Bok & Keller, 2004).

Le tableau 9 récapitule un certain nombre d'études dans lesquelles différentes plantes ont été évaluées pour leur capacité à inhiber la croissance d'*A. flavus* et la production d'AFB1. Contrairement aux huiles essentielles, l'inhibition de la production d'AFB1 avec des extraits n'est pas toujours directement liée à l'inhibition de la croissance. Ceci est très intéressant, car, de ce fait, la production d'AFB1 pourrait être inhibée sans modifier la biodiversité et sans laisser de vide écologique susceptible d'être mis à profit par d'autres espèces pathogènes.

Tableau 8. Effet inhibiteur de quelques extraits de plantes sur la croissance d'*A. flavus* et la production d'AFB1

Matière végétale	Type d'extrait	Concentration utilisée	Inhibition de la croissance d' <i>A. flavus</i>	Inhibition de la production d'AFB1	Référence
Hysope (<i>Micromeria graeca</i>)	Extrait aqueux	0,625 mg/mL 10 mg/mL	0% 0%	52% 92%	(El Khoury et al., 2017)
Agave (<i>Agave asperima</i>)	Extrait méthanolique	0,125 mg/mL 0,2 mg/mL	11% 42%	35 % 98 %	(Sánchez et al., 2005)
Agave (<i>Agave striata</i>)	Extrait méthanolique	0,375 mg/mL 0,75 mg/mL	0% 30%	60% 99%	
Acacia (<i>Acacia catechu</i>)	Extrait méthanolique	2 mg/mL	26,2%	80%	(Thippeswamy et al., 2014)
Arimedah (<i>Acacia ferruginea</i>)	Extrait méthanolique		23,8%	74,6%	
Red Lucky Seed (<i>Adenanthera pavonina</i>)	Extrait chloroformique		19,6	61,6%	
Arbre à tourteaux (<i>Albizia amara</i>)	Extrait chloroformique		59%	100%	
Siris noir (<i>Albizia odoratissima</i>)	Extrait méthanolique		22,6%	70%	
Arbre à pluie (<i>Albizia saman</i>)	Extrait méthanolique		57,8%	100%	
Bakli (<i>Anogeissus latifolia</i>)	Extrait méthanolique		27,8%	83,3%	

Dividivi (<i>Caesalpinia coriaria</i>)	Extrait méthanolique		18,6%	70%	
Candelillo (<i>Cassia spectabilis</i>)	Extrait chloroformique		42,4%	93,3%	
Bois d'arnette (<i>Dodonaea viscosa</i>)	Extrait méthanolique		14,3%	66%	
Mezquite (<i>Prosopis juliflora</i>)	Extrait méthanolique		22,2%	73,3%	
Ombre de nuit indienne (<i>Solanum indicum</i>)	Extrait chloroformique		63,5%	100%	
Laiteron maraîcher (<i>Sonchus oleraceus</i>)	Extrait aqueux	1,5 mg/mL 5 mg/mL	nr	26% 78%	(El-Desouky, 2021)
Endive sauvage (<i>Cichorium pumilum</i>)		1,5 mg/mL 5 mg/mL	nr	19% 69%	
Pourpier (<i>Portulaca oleracea</i>)		1,5 mg/mL 5 mg/mL	nr	32% 82%	
Myrtille (<i>Vaccinium myrtillus L.</i>)	Extrait aqueux	1,3 mg/mL 2,5 mg/mL	0% 0%	50% 95%	(Vamvakas et al., 2021)
	Extrait méthanolique	3,3 mg/mL 6 mg/mL	0% 0%	50% 90%	
Sarrasin (<i>Fagopyrum esculentum</i>)	Extrait polyphénolique	50 ng/mL 100 ng/mL	nr 37%	92% 93%	(Nobili et al., 2019)
	Extrait lipophile	10 µg/mL 100 µg/mL	74% nr	67% 89%	
Thym (<i>Thymus daenensis</i>)	Extrait éthanolique	1 mg/mL 4 mg/mL	20% 100%	52% 97%	
	Extrait d'hydroéthanol	1 mg/mL 4 mg/mL	20% 90%	52% 97%	
	Extrait aqueux	1 mg/mL 6 mg/mL	20% 65%	11% 61%	
Sarriette <i>Satureja khozistanica</i>	Extrait éthanolique	1 mg/mL 4 mg/mL	73% 100%	72% 100%	(Gorran et al., 2013)
	Extrait d'hydroéthanol	1 mg/mL 4 mg/mL	51% 65%	50% 100%	
	Extrait aqueux	1 mg/mL 6 mg/mL	14% 63%	6% 48%	
Sarriette (<i>Satureja macrosiphonia</i>)	Extrait éthanolique	0,5 mg/mL 6 mg/mL	5% 88%	20% 75%	
	Extrait d'hydroéthanol	0,5 mg/mL 6 mg/mL	5% 78%	20% 78%	
	Extrait aqueux	0,5 mg/mL 6 mg/mL	5% 60%	20% 78%	

nr= Non rapporté

Il est important de poursuivre l'étude du potentiel anti-aflatoxinogène de ces extraits aqueux, car ils présentent de nombreux avantages par rapport aux HE :

- Leur toxicité est probablement négligeable ou très faible comparée à celle des HE, surtout en cas d'exposition orale puisque c'est le mode d'utilisation classique de la plupart de ces plantes.

- Les changements organoleptiques dans les aliments peuvent être beaucoup plus faibles qu'avec les HE, en raison des niveaux beaucoup plus faibles de composés aromatiques volatils (Skotti et al., 2014).

- La méthode d'obtention de ces extraits, principalement aqueux, est plus simple à mettre en œuvre, à l'échelle industrielle, mais aussi localement, par les petits producteurs. Elle est aussi beaucoup moins énergivore.

Cependant, il est clair que l'application directe d'extraits aqueux sur des grains en stockage, c'est à dire préalablement séchés, peut être problématique. Il semble donc nécessaire de développer, en parallèle, des formulations adaptées, voire sèches, pour leur utilisation lors du stockage des matières premières agricoles.

I.3.3.2.2 Huiles essentielles

Les huiles essentielles (HE) sont un mélange de métabolites secondaires volatils de la famille des terpènes obtenus à partir d'une matière première principalement par hydro-distillation à partir de fruits, feuilles, bois, etc. par un procédé mécanique ou par distillation sèche (Turek & Stintzing, 2013).

Les HE peuvent être composées de quelques substances seulement ou d'un mélange complexe de plus de 100 substances individuelles. Ils sont principalement composés de terpénoïdes lipophiles (mono- et sesquiterpènes), de phénylpropanoïdes ou de dérivés d'hydrocarbures aliphatiques à chaîne courte de faible poids moléculaire. Ce sont des composés lipophiles qui se distinguent par leurs propriétés aromatiques, d'où leur utilisation comme arômes ou parfums (Turek & Stintzing, 2013). En outre, certains composés sont également utilisés pour leurs nombreuses activités biologiques, notamment bactéricides, insecticides et fongicides (M. B. Isman, 2000).

De nombreux travaux ont étudié leur usage potentiel comme fongicides et/ou inhibiteurs de mycotoxines (Abd El-Aziz et al., 2015; Bluma et al., 2008; Friedman & Rasooly, 2013; M. B. Isman, 2000; M. Isman & Machial, 2006; Kedia et al., 2014; Loi et al., 2020; Paranagama et al., 2003; Prakash et al., 2015; Rasooli et al., 2008; J. Tian et al., 2012). Les résultats des principales études sont résumés dans le tableau 8 et montrent que de

nombreuses HE sont capables de bloquer la synthèse de l'AFB1. Cependant, dans la plupart des cas, cette inhibition est liée à un ralentissement ou à une inhibition de la croissance fongique.

Tableau 9. Effet inhibiteur de quelques huiles essentielles sur la croissance d'*A. flavus* et la production d'AFB1

Huile essentielle	Concentration utilisée	Inhibition de la croissance d' <i>A. flavus</i> *	Inhibition de la production d'AFB1*	Référence
Agérate (<i>Ageratum conyzoides</i>)	0,1 µg/mL	49%	100%	(Nogueira et al., 2010)
	0,04 µg/mL	30%	65%	
Anis (<i>Pimpinella anisum</i>)	0,5 µg/g	100%	100%	(Bluma et al., 2008)
Arbre à encens (<i>Boswellia sacra</i>)	10 µg/mL	16,6%	50%	(EL-Nagerabi et al., 2013)
	40 µg/mL	83,3%	83,3%	
Basilic (<i>Ocimum sanctum</i>)	0,1 µg/mL	72,5%	88,4%	(Kumar et al., 2010)
	0,2 µg/mL	90,1%	100%	
Basilic doux (<i>Ocimum basilicum</i>)	4% (v/v)	60%	52%	(Atanda et al., 2007)
Bétel (<i>Piper betle</i>)	0,4 µl/mL	26,7%	74,50%	(Prakash et al., 2010)
	0,6 µl/mL	77,8%	100%	
Callistemon (<i>Callistemon lanceolatus</i>)	0,546 mg/mL	79,6%	100%	(Shukla et al., 2012)
	0,819 mg/mL	100%	100%	
Cannelle (<i>Cinnamomum jensenianum</i>)	4 µl/mL	63%	84%	(Tian et al., 2012)
	6 µl/mL	84%	100%	
Cardamome (<i>Amomum subulatum</i>)	0,25 mg/mL	25%	69%	(Singh and Srivastava, 2008)
	0,5 mg/mL	74%	100%	
Cassia-Cannelle Chinoise (<i>Cinnamomum cassia</i>)	4% (v/v)	0%	96%	(Atanda et al., 2007)
Citronnelle (<i>Cymbopogon citratus</i>)	0,2 mg/mL	3%	100%	(Paranagama et al., 2003)
Coriandre (<i>Coriandrum sativum</i>)	0,75 µl/mL	66,5%	25%	(Deabes et al., 2011)
Cumin (<i>Cuminum cyminum</i>)	0,4 µl/mL	52%	67%	(Kedia et al., 2014b)
	0,5 µl/mL	91%	100%	
Curcuma (<i>Curcuma longa</i>)	0,5 % (v/v)	nd	99%	(Ferreira et al., 2013)
Fenouil (<i>Foeniculum vulgare</i>)	0,75 µl/mL	54,4%	23%	(Deabes et al., 2011)
Feuilles de Laurier (<i>Laurus nobilis</i>)	5% (v/v)	-36,4%	46%	(Atanda et al., 2007)
Menthe (<i>Mentha spicata</i>)	0,6 µl/mL	66,4%	50,2%	(Kedia et al., 2014a)
	0,9 µl/mL	84,9%	100%	
Origan (<i>Origanum majoricum</i>)	100 µl/mL	40%	25,6%	(García-Díaz et al., 2019)
	500 µl/mL	100%	100%	

Origan (<i>Origanum virens</i>)	350 µl/mL	nd	7.3%	(García-Díaz et al., 2020)
	1000 µl/mL		78.1%	
Origan (<i>Origanum vulgare</i>)	10 µl/mL	5%	2,3%	(García-Díaz et al., 2019)
	100 µl/mL	100%	99,7%	
Palmarosa-Géranium des Indes (<i>Cymbopogon martinii</i>)	100 µl/mL	3%	26.8%	(García-Díaz et al., 2019)
	500 µl/mL	60%	94.2%	
Romarin (<i>Romarinus officinalis</i>)	0,3 µl/mL	50%	80%	(Mishra et al., 2015)
	0,4 µl/mL	95%	100%	
Sarriette de montagne (<i>Satureja montana</i>)	450 ppm	0%	100	(Rasooli et al., 2008)
	10 µl/mL	0%	52%	(García-Díaz et al., 2019)
Thym (<i>Thymus vulgaris</i>)	500 µl/mL	0%	90%	
	350 µl/mL	nd	84,7%	(García-Díaz et al., 2020)
	1000 µl/mL	nd	86,3%	
Verveine (<i>Lippia rugosa</i>)	10 µl/mL	20%	23%	(García-Díaz et al., 2019)
	100 µl/mL	100%	100%	
	0,3 µl/mL	46,9%	75,6%	(Kumar et al., 2008)
Thym (<i>Thymus vulgaris</i>)	0,7 µl/mL	100%	100%	(García-Díaz et al., 2019)
	10 µl/mL	5%	35%	
Verveine (<i>Lippia rugosa</i>)	500 µl/mL	8%	100%	(Tatsadjieu et al., 2009)
	600 µg/mL	5%	61%	
Verveine (<i>Lippia rugosa</i>)	1000 µg/mL	5%	100%	

* : exprimé en % par rapport à une culture contrôle non exposée au produit testé

Dans certaines études, plusieurs HE ont été caractérisées et les composés actifs responsables de leur activité antifongique et/ou antiaflatoxigène ont été identifiés. Dans la plupart des HE, ce sont des composés communs qui sont principalement responsables de l'inhibition : eugénol, thymol, citral, limonène, carvacrol, menthol, eucalyptol, carvone, linalol (Abbaszadeh et al., 2014; Chulze, 2010; Kedia et al., 2014; Xiang et al., 2020).

En raison de leur capacité à inhiber les champignons et, secondairement, la production d'aflatoxines, les HE peuvent être considérées comme une stratégie de remplacement des pesticides. Elles sont également considérées comme naturelles, respectueuses de l'environnement et non toxiques à doses contrôlées (Prakash et al., 2015). Certaines de ces HE sont déjà commercialisés en tant que protecteurs de cultures tels que E-Rase™ (HE de *Simmondsia californica*) ; Sporan™ (HE de *Rosemarinus officinalis*), Promas™ (HE de *Thymus vulgaris*), Cinnamite et Valero™ (30% HE de *Cinnamomum*), Talent® (HE de cumin ou d'aneth) et eugénol-Tween® (Dayan et al., 2009; M. B. Isman, 2000; Prakash et al., 2015).

Cependant, l'usage d'HE présente également certains inconvénients et limites qui entravent leur utilisation en alimentation. Leur stabilité est réduite à cause de leur volatilité car elles sont constituées de composés à faible température d'ébullition. Elles

peuvent également se dégrader en cas d'exposition à la lumière, à l'air, à l'eau, à la chaleur ou à des contaminants métalliques ce qui peut impacter la structure chimique des constituants par des réactions d'oxydation, d'isomérisation, de cyclisation ou de déshydrogénation (Turek & Stintzing, 2013). En se dégradant, les HE perdent leur activité biologique. Leur renouvellement continu est donc nécessaire pour maintenir l'effet protecteur (Kedia et al., 2014). En outre, les composés formés par leur dégradation peuvent être toxiques.

Concernant leur toxicité, la plupart des HE sont considérées comme faiblement toxiques. Cependant, utilisées pures ou à des concentrations légèrement supérieures à celles utilisées pour la lutte contre les champignons, elles pourraient également être phytotoxiques, et il semble que les HE les plus efficaces soient également les plus phytotoxiques (M. B. Isman, 2000; M. Isman & Machial, 2006). D'autre part, l'exposition aux huiles essentielles ou à leurs composants peut également être toxique pour les mammifères. Plusieurs cas d'intoxication humaine aux HE ont été signalés. Un garçon de 2 ans a ingéré 5 ml d'huile essentielle de clou de girofle, ce qui a entraîné un coma, une coagulopathie et une atteinte hépatique aiguë (Hartnoll et al., 1993). L'huile essentielle d'hysope peut induire une neurotoxicité (convulsions) après une inhalation excessive, en raison de sa forte teneur en cétones (40% de pinocamphone et 30% d'iso-pinocamphone) (Tisserand & Young, 2014). En 2008, cinq cas d'empoisonnement aux HE de citronnelle ont également été signalés et leur ingestion a également entraîné la mort d'un enfant (Temple et al., 2008). Le linalol, présent dans les HE de thym et de lavande, est également toxique pour les cellules dermiques humaines (Prakash et al., 2015).

Finalement, en raison de leur teneur élevée en composés aromatiques, les HE sont souvent utilisés dans l'industrie cosmétique pour leur odeur agréable. Cependant, cette même caractéristique représente une limite importante pour leur usage en alimentation car elles pourraient modifier fortement les qualités organoleptiques des aliments et en particulier en altérer l'odeur et le goût (A. Kumar et al., 2010).

I.3.3.2.3 Molécules isolées

Ces dernières années, un grand nombre de molécules ont été isolées et purifiées à partir d'extraits de plantes. Pour certains d'entre elles, leur effet sur la croissance fongique et sur la production d'AFB1 a été étudié (Tableau 10). En outre, le développement de techniques telles que la q-PCR a permis d'étudier leur mécanisme d'action par l'analyse

de leur impact sur l'expression des gènes, et notamment ceux impliqués dans la synthèse de l'AFB1.

Ces études moléculaires ont montré ce sont les régulateurs internes du cluster *aflR* et *aflS*, qui sont inhibés, inhibant à leur tour l'expression des autres gènes du cluster (Jahanshiri et al., 2012)

Tableau 10. Effet inhibiteur de différentes molécules issues de plantes sur la croissance d'*A. flavus* et la production d'AFB1

Molécule	Concentration utilisée	Inhibition de la croissance d' <i>A. flavus</i>	Inhibition de la production d'AFB1	Référence
Acide caféique	12 mM	0%	95%	(J. H. Kim et al., 2008)
Acide gallique	0,8 g/L	20%	100%	(Zhao et al., 2018)
Cinnamaldéhyde	52 mg/L	24,4%	38%	(Sun et al., 2016)
	104 mg/L	100%	100%	
Cinnamaldéhyde	0,4 mmol/L	0%	68,9	(Liang et al., 2015)
	0,8 mmol/L	100%	100%	
Citral	0,56 mmol/L	0%	41,8	
	2,8 mmol/L	100%	100%	
Eugenol	0,48 mmol/L	0%	65%	
	0,8 mmol/L	0%	95,4%	
Curcumine	0,1 mL/L	49,2%	nr	(Ferreira et al., 2013)
	0,5 mL/L	96%	nr	
Eugenol	0,05 mM	0 %	30,9%	(Caceres et al., 2016)
	0,5 mM	11,4%	100%	
Hespéridine	0,15mM	nr	80%	(Salas et al., 2016)
	0,30 mM	nr	91%	
Naringine	0,15mM	nr	65%	
	0,30 mM	nr	70%	
Néohespéridine	0,15mM	nr	86%	
	0,30 mM	nr	68%	
Pipérine	0,0006	0%	30%	(Caceres et al., 2017)
	0,17	35%	100%	
Pipérine	0,7 mg/mL	40%	75%	(Lee et al., 2002)
Pipérlongumine	0,2 mg/mL	15%	96%	
Pipéroctadécalidine	0,7 mg/mL	47%	100%	
Pipéronaline	0,7 mg/mL	30%	70%	
Scopolétine	2 mM	25%	100%	(Gnonlonfin et al., 2011)
Syringate de méthyle	0,5 mM	0%	40%	(Jermnak et al., 2012)
	4 mM	10%	100%	

La plupart des molécules qui ont été étudiées sont des composés phénoliques qui présentent des capacités antioxydantes élevées. Ces molécules peuvent inhiber jusqu'à 100% de la production d'AFB1, sans inhiber la croissance d'*A. flavus*. En outre, nombre de ces molécules sont classées comme sûres (GRAS). Ces informations nous amènent à penser que les plantes ayant un contenu élevé en composés phénoliques et une capacité

antioxydante importante peuvent être des candidates de choix pour étudier leur effet sur la production d'AFB1.

Partie II : Travail de thèse

II.1 Choix des plantes

II.1.1 Introduction

Le monde végétal constitue une ressource quasi-illimitée de molécules naturelles à valeur médicinale, alimentaire, cosmétique, etc.

Pour leur survie et plus particulièrement pour la communication, l'attraction de pollinisateurs, la défense contre des ravageurs ou des pathogènes, les plantes synthétisent des métabolites secondaires ayant une grande diversité d'action. Avant même leur identification, de nombreuses civilisations anciennes dans le monde entier ont utilisé les métabolites secondaires des plantes, sous forme d'extraits, en premier lieu pour leurs propriétés médicinales pour traiter diverses maladies.

Au Mexique, l'utilisation de plantes médicinales pour le traitement de nombreuses maladies est une pratique ancienne et courante dans les civilisations préhispaniques Aztèques et Mayas, comme le raconte Bernardino de Sahagún (De Sahagún, 1929). Ces connaissances, transmises de génération en génération, sont encore utilisées dans de nombreuses communautés et génèrent l'intérêt des scientifiques (Calvo Irabién, 2012). Elles constituent une base intéressante pour la sélection de plantes pour divers domaines d'application tels que la pharmacologie et la phytochimie.

Les métabolites secondaires des plantes peuvent être classés sur la base de leur structure chimique, de leur solubilité dans divers solvants ou de la voie de biosynthèse dont ils sont issus. Les familles de molécules généralement considérées comme les plus importantes sont les composés phénoliques, les terpènes, les stéroïdes, et les alcaloïdes, car ils présentent des activités biologiques importantes (Tiwari & Rana, 2015).

Les produits naturels ont largement contribué au développement de médicaments majeurs utilisés actuellement en médecine. Il est de plus en plus admis que les produits naturels peuvent constituer une source d'inspiration pour la synthèse de nouveaux principes thérapeutiques, en particulier grâce à l'essor de la chimie combinatoire (Newman & Cragg, 2020). Cependant, l'identification de structures chimiques présentant des activités biologiques importantes se heurte d'une part à la difficulté d'en effectuer la rétrosynthèse et, d'autre part, à la limitation de leur champ d'action lorsque ces molécules sont employées individuellement hors de leur milieu complexe. Ainsi la perte de l'effet

synergique observé dans les extraits primaires lors de l'utilisation des composés purifiés peut conduire à l'abandon des travaux de recherche sur certaines de ces molécules.

Récemment, la recherche de composés phytochimiques de type polyphénolique présentant de fortes propriétés antioxydantes a suscité un intérêt croissant pour le développement de thérapies moléculaires combinées et de médicaments supplémentaires (Skouta et al., 2018).

Fort de ce constat, le choix du matériel végétal utilisé dans notre travail s'est orienté vers des plantes riches en composés polyphénoliques, dont les propriétés antioxydantes étaient avérées. Ainsi trois plantes mexicaines ont été sélectionnées pour leurs intérêts en médecine traditionnelle et la présence de composés phénoliques : *Mimosa tenuiflora*, *Larrea tridentata* et *Lippia graveolens*.

II.1.2 Description botanique des plantes choisies

Le tableau 11 récapitule les données générales des trois plantes choisies dans cette étude: nom commun, nom botanique, répartition et morphologie.

Ces trois plantes appartiennent à la même classe (*Magnoliopsida*), mais à des familles différentes :

- *M. tenuiflora* appartient à la famille des Fabacées, l'une des familles les plus riches en espèces
- *L. tridentata*, appartient à la famille des *Zygophyllaceae* qui se caractérise par des plantes herbacées, des arbustes ou de petits arbres (Garcia, 2012)
- *L. graveolens* appartient à la famille des *Verbenaceae*, considérée comme la plus importante par ses caractéristiques aromatiques. Le genre *Lippia* comprend trois espèces, la plus importante étant *graveolens* (Granados-Sánchez et al., 2013).

Tableau 11. Informations générales sur *M. tenuiflora*, *L. tridentata* et *L. graveolens*

Nom latin	Nom courant	Classification botanique	Distribution	Morphologie	Parties utilisées	Référence
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Tepescahuite Tepescohuite Tepesquehuite Jurema preta	<i>Magnoliopsida</i> <i>Fabales</i> <i>Fabaceae</i> <i>Mimosoideae</i> <i>Mimosa</i> <i>tenuiflora</i>	Forêts tropicales à feuilles caduques des Amériques (originaire du sud-est du Mexique au nord du Brésil et du Venezuela)	Arbre de 1 à 8 m de haut, diamètre de 10 à 15 cm, branches sombres avec des poils glanduleux, des aiguilles et des stipules caduques, feuilles de couleur vert clair sont bipennées, alternées entre 2 et 7 cm de long et de 1,5 à 2 cm de large, avec des fleurs tétramères, roses à jaunes	Bois et écorce	(Camargo-Ricalde, 2000; Camargo-Ricalde & Grether, 1998; Cruz et al., 2016; S.-A. Martel-Estrada, 2014; Rivera-Arce, Gattuso, et al., 2007; Souza et al., 2008)
<i>Larrea tridentata</i>	Creosote Bush Gobernadora Hediondilla Chaparral	<i>Magnoliopsida</i> <i>Sapindales</i> <i>Zygophyllaceae</i> <i>Larreoideae</i> <i>Larrea</i> <i>tridentata</i>	Zones désertes du Texas, Nevada, Arizona, Nouveau-Mexique, Californie aux États-Unis et Sonora, Baja California, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí et Durango au Mexique	Arbuste aromatique à feuilles persistantes de 1 à 3 m de haut, ramifié et noueux. Les feuilles sont opposées, d'environ 1 cm de long, à l'odeur pénétrante, de couleur verte ou vert-jaunâtre. Les fleurs complètes d'environ 2,5 cm de diamètre sont portées solitaires sur les axes, avec cinq pétales jaunes à griffes	Feuilles et branches	(Arteaga et al., 2005; CONABIO, 2009; Garcia, 2012, 2012; Lira-Saldívar, 2003)
<i>Lippia graveolens</i>	Origan mexicain Origan cimarrón Origan sylvestre	<i>Magnoliopsida</i> <i>Lamiales</i> <i>Verbenaceae</i> <i>Lippia</i> <i>Graveolens</i>	Originaire du Mexique, on peut la trouver dans le sud des États-Unis d'Amérique et dans une partie de l'Amérique centrale	Arbuste aromatique à feuilles caduques dont la hauteur varie de 0,20 à 2 m, il possède des tiges ligneuses très ramifiées à partir de la base, avec des feuilles oblongues ou elliptiques, finement crénelées. Ses fleurs sont disposées en épis subglobuleux avec des corolles zygomorphes blanches	Feuilles	(Granados-Sánchez et al., 2013, 2013; Moreno Zuccolotto, 2010; Muñoz-Miranda et al., 2019; Rosales Aleman, 2015)

II.1.2.1 *Mimosa tenuiflora*



Figure 8. Arbre de *M. tenuiflora* (a), écorce de *M. tenuiflora* (b), branche et feuilles de *M. tenuiflora* (c)(Medeiros, 2011).

L'écorce du *M. tenuiflora* (Figure 8) est largement utilisée dans la médecine traditionnelle mexicaine depuis l'époque préhispanique comme un remède efficace pour traiter les brûlures et les blessures de la peau, aussi que pour le traitement de bronchites, de la toux (Agra et al., 2007), des ecchymoses, des inflammations, des douleurs dentaires, des douleurs menstruelles, des maux de tête, de l'hypertension, de la fièvre (de Albuquerque et al., 2007; S. A. Martel-Estrada et al., 2014), de tumeurs et de maladies de la peau (Cadena-Iñiguez, 2014), de problèmes gastro-intestinaux (Camargo-Ricalde & Grether, 1998) et des varices (S. A. Martel-Estrada et al., 2014). Elle est également utilisée dans la construction de clôtures et de barrières et comme combustible. Cette plante peut aussi être utilisée pour la régénération des sols après une mono-culture. Ses tanins sont utilisés pour la teinture des fourrures et des tissus (Camargo-Ricalde, 2000; Camargo-Ricalde & Grether, 1998; Rivera-Arce, Gattuso, et al., 2007).

II.1.2.2 *Larrea Tridentata*



Figure 9. Arbuste de *Larrea tridentata* (a), fleur (b), fleur, feuilles et branches (c) (CONABIO, 2009).

Les Amérindiens utilisent depuis longtemps les feuilles de *L. tridentata* (Figure 9) pour traiter les troubles digestifs, les rhumatismes, l'arthrite, les maladies vénériennes, les plaies, la bronchite, la varicelle, la grippe et le rhume (Clark, 2003). Elle était considérée comme une plante "panacée", avec de nombreuses utilisations signalées en phytothérapie : pour les infections des voies génito-urinaires et respiratoires, les calculs rénaux, les inflammations musculaires, les lésions cutanées, les spasmes intestinaux, les troubles utérins, et comme diurétique, anticancéreux, antifongique et antimicrobien (Brinker, 1993). Actuellement un composant de cette plante, l'acide nordihydroguaiarétique (NDGA), est extrait pour son action antioxydante notamment dans l'industrie alimentaire. Il peut être également intégré dans la fabrication de produits pharmaceutiques, de lubrifiants, de caoutchouc, ou comme molécule-plateforme pour la synthèse de polymères de type phénolique et de fongicides et insecticides (Garcia, 2012).

II.1.2.3 *Lippia Graveolens*

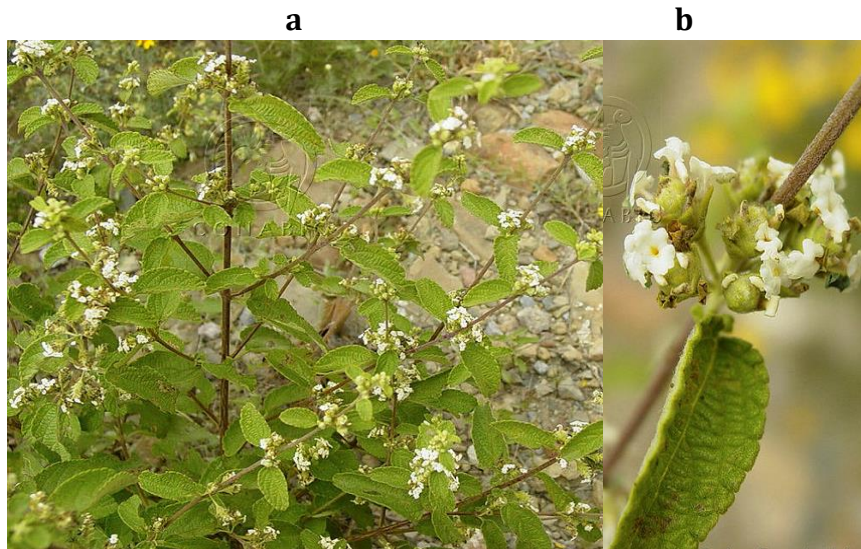


Figure 10. Arbuste de *Lippia graveolens* (a), , fleurs et feuille (b) (Velazco Macias, 2012)

Lippia graveolens est une plante aromatique de grande valeur alimentaire et médicinale, principalement grâce à l'huile essentielle présente dans ses feuilles. Ces dernières sont également utilisées comme condiment. La collecte nationale mexicaine annuelle de la plante sauvage s'élève à 6 500 tonnes, exportée à 90% (Villavicencio Gutiérrez et al., 2010). Sa collecte est complémentaire de l'agriculture saisonnière dans les zones arides et semi-arides (Gonzalez et al., 2007). La principale utilisation de *Lippia graveolens* se fait, dans l'industrie alimentaire, sous forme déshydratée ou sous forme concentrée comme huile.

II.1.3 Composition chimiques des plantes

Dans cette partie, nous allons présenter les principaux composés bioactifs identifiés dans des trois plantes étudiées, avec une attention particulière pour les composés phénoliques.

II.1.3.1 *Mimosa tenuiflora*

II.1.3.1.1 Composés phénoliques

Nascimento et al (2016), ont démontré la présence de composés phénoliques (tanins, flavonoïdes et xanthones) dans un extrait hydro-éthanolique d'écorce de *M. tenuiflora*

(Marcel et al., 2016). Cruz et ses collègues ont également isolé et identifié plusieurs flavones méthoxylées dans l'écorce de *M. tenuiflora* (Cruz et al., 2016).

Quelques études (Marcel et al., 2016; Rivera-Arce, Gattuso, et al., 2007) mentionnent la présence de tanins condensés dans l'écorce de *M. tenuiflora*, et certains auteurs attribuent même certaines propriétés biologiques à la présence de ces composés dans différents extraits. Cependant, à ce jour, il n'y a pas de données précises sur la quantité de tanins condensés présents dans l'écorce ou sur l'identification de ces composés (Camargo-Ricalde, 2000). Cependant, il a été démontré que les tanins représentent environ 16% du total de l'écorce de *M. tenuiflora*, la plupart d'entre eux étant des proanthocyanidines (Rivera-Arce, Gattuso, et al., 2007).

D'autres flavonoïdes dits "rares" ont été isolés de feuilles de *M. tenuiflora* : tenuiflorines A, B et C, ainsi que des méthoxycapillarissines (León et al., 2004) (Figure 11).

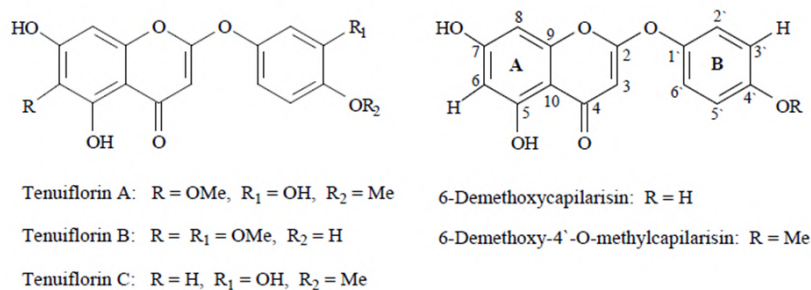


Figure 11. Phénoxychromones isolées de l'écorce de *Mimosa tenuiflora*

Des chalcones ont aussi été identifiées (Figure 12) à partir de l'écorce de *M. tenuiflora* (Dominguez et al., 1989).

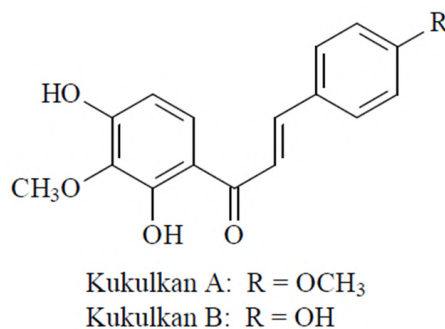


Figure 12. Chalcones isolées de l'écorce de *Mimosa tenuiflora*

II.1.3.1.2 Autres molécules actives

L'écorce de *M. tenuiflora* est riche en saponines, triterpènes (lupéol), alcaloïdes, saccharides (glucose, xylose, rhamnose, arabinose, amidon), phytostérols, et minéraux (oxalate de calcium). La présence de deux alcaloïdes, la 5-hydroxytryptamine et la N, N-diméthyltryptamine (figure 13a) a été décrite dans l'écorce de *M. tenuiflora*. Ces derniers sont responsables de l'effet psychoactif observé lors d'ingestion d'une décoction (Souza et al., 2008).

De même, un autre alcaloïde, la yuremamine, (figure 13b) a été isolé, purifié et identifié à partir de l'écorce du *M. tenuiflora* en 2005 (Vepsäläinen et al., 2005).

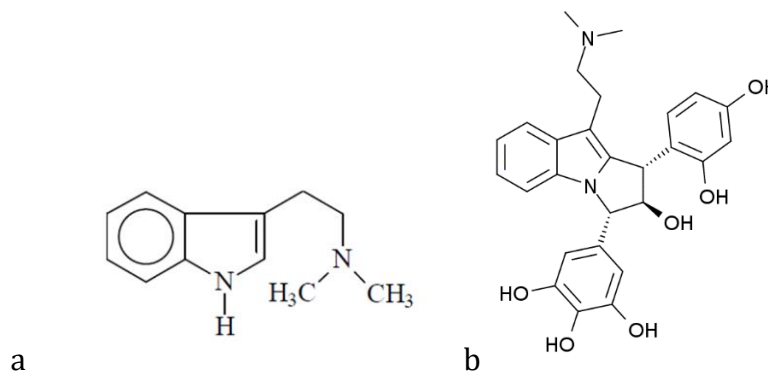


Figure 13. a) N, N-diméthyltryptamine (DMT) b) Yuremamine

Anton et al. (1993) ont identifié trois saponines triterpénoïdes (Figure 14) à partir de l'écorce de *M. tenuiflora* (Anton et al., 1993).

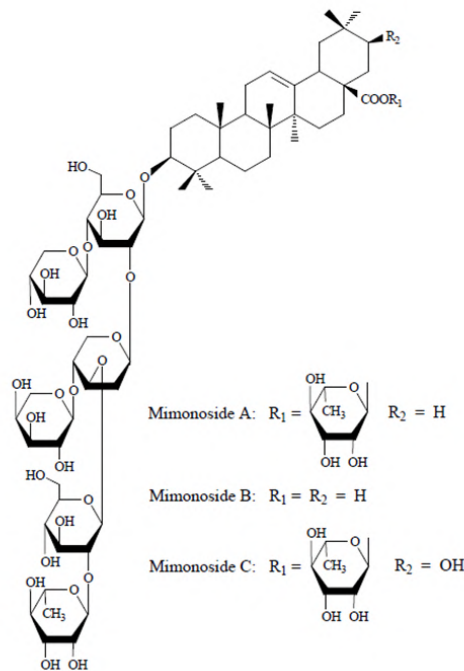


Figure 14. Saponines triterpénoïdes isolées de l'écorce de *Mimosa tenuiflora*

II.1.3.2 *Larrea tridentata*

L'une des premières études sur l'identification des principaux composés de *L. tridentata* a été réalisée en 1993 (Tableau 12). Dans cette étude, ont été identifiés des composés phénoliques (lignanes, flavonoïdes), des saponines, des acides aminés et des minéraux à des teneurs élevées dans des feuilles (Brinker, 1993).

Tableau 12. Principaux constituants de *Larrea tridentata* (Brinker, 1993).

Contenu (% poids sec)	Type de composé	Composés
Dans les feuilles		
16-21	Lignanes phénoliques	Acide dihydroguaiarétique Hémi-norisoguaiacine Acide nor-dihydroguaiarétique Nordihydroguaiacine
5-7,5	Flavonoïdes	Apigénine Kaempférol
10-15	Saponines Triterpènes	Larréagénine Acide larréaique
0,1-0,2	Monoterpènes Hydrocarbures	Alpha pénène Delta-3-carène Limonène
	Aromatiques	Benzaldéhyde Benzylacétate Benzyl Butane

		Méthyl naphthalène
	Phytostérols	Beta-sitostérol Cholestérol Campestérol
	Glucides	Glucose Saccharose
Dans la tige		
70,1	Lipides	(C46-C56)
16,6	Acides aminés	Phénylalanine Isoleucine Acide glutamique Acide aspartique Glycine
34,4 mg/kg 0,198 mg/100g	Vitamines	Carotène Vitamine C
13,7	Minéraux	Sodium Potassium Calcium Magnésium Fer Soufre Phosphore

II.1.3.2.1 Composés phénoliques

L. tridentata produit plus de 20 flavonoïdes connus (Bashyal et al., 2017) dont la quercétine (Clark, 2003) et les flavones : juglanine, liquiritine, 3',4',5,7-tetraacetoxyflavone et 3',4',5,7-tetramethylquercetine (Skouta et al., 2018).

Sagaste et collaborateurs en 2019, rapportent la présence de plusieurs composés phénoliques dans un extrait méthanolique de *L. tridentata* : l'acide chlorogénique (0,920mg/g feuille sèche), l'acide caféique (2,288mg/g), l'acide coumarique (0,916 mg/g), l'acide férulique (0,849 mg/g), la catéchine (1,967 mg/g) et l'épicatéchine (1,866 mg/g) (Sagaste et al., 2019).

Des lignanes sont aussi présents dans les feuilles de *L. tridentata* (Bashyal et al., 2017; Konno et al., 1989, 1990; Skouta et al., 2018). Le lignane le plus étudié se trouve dans la résine des feuilles. C'est l'acide nordihydroguaiaretique (NDGA ou beta, gamadiméthyl-alpha, delta-bis(3,4-dihydroxyphényl) butane) (Figure 15-a).

La concentration de NDGA est d'environ 50% de la résine, ce qui représente 10-15% du poids sec des feuilles. L'autre moitié de cette résine compte également plus de 20 flavonoïdes de type méthyl aglycones (Sakakibara et al., 1976). Un autre lignane dérivé de

la NDGA a été isolé à partir de la résine du feuillage de *L. tridentata*, l'acide 3-O-méthyl nordihydroguaiaretique nommé Mal. 4 (Figure 15-b) (Gnabre et al., 1995).

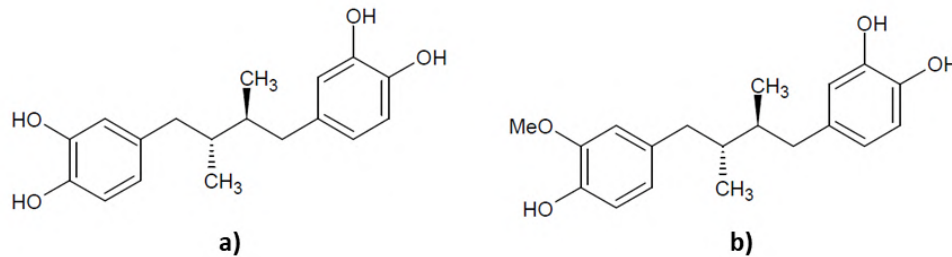


Figure 15. NDGA (a) et Mal. 4 (b) identifiés dans *L. tridentata*

II.1.3.2.2 Autres molécules actives

Deux amines ont également été identifiées à partir de l'extrait hydro-éthanolique de *L. tridentata* : la crimidine et la tyramine (Skouta et al., 2018), ainsi que des saponines triterpénoïdes, des monoterpènes et des phytostérols (Brinker, 1993).

II.1.3.3 *Lippia graveolens*

Les études sur les composés bioactifs de *Lippia* ont visé à l'identification des composés phénoliques et la caractérisation de son huile essentielle.

II.1.3.3.1 Composés phénoliques

Dans une étude récente (Cortés-Chitala et al., 2021), trois extraits hydro-éthanoliques de feuilles de *L. graveolens* provenant de trois régions différentes du Mexique, ont montré des teneurs élevées en polyphénols. Les concentrations phénoliques se situaient à 95,74 mg EAG/g masse sèche ce qui est très élevé par rapport à celles rapportées pour d'autres herbes aromatiques comme le basilic (19,5), la coriandre (17,3), le gingembre (13,7), la citronnelle (13,6), et l'origan espagnol (88,5) (Cortés-Chitala et al., 2021). L'identification et la quantification de composés présents dans des extraits de *L. graveolens* par LC-ESI-QTOF-MS ont mis en évidence la présence de 40 composés différents dont des flavonoïdes, des tanins et des quinones. Les plus notables pour l'activité globale de l'extrait sont des flavonoïdes appartenant à de nombreuses sous-classes : flavone, flavonol, flavanol, dihydroflavonol, flavanone, et dihydrochalcone (Cortés-Chitala et al.,

2021; Quintanilla-Licea et al., 2020). Auparavant, des flavonols et flavanols avaient été identifiés dans le genre *Lippia* (Gonzalez et al., 2007; Lin et al., 2007).

II.1.3.3.2 Autres molécules actives

D'autres types de composés peuvent être obtenus en fonction de la méthode d'extraction utilisée, en particulier des terpènes.

Hernandez et al. (2014) décrivent 9 composés identifiés par GC-MS à partir de l'huile essentielle de parties aériennes de *L. graveolens*. Ils rapportent que le carvacrol, l'acétate d' α -terpinyle, le m-cymène, le thymol et le β -pinène sont les composés majeurs (Hernandez et al., 2009). Un autre composé terpénique important isolé de *L. graveolens* est le carvacrol, obtenu sous forme d'huile incolore à partir du fractionnement bioguidé d'un extrait méthanolique (Quintanilla-Licea et al., 2014).

Dans une étude de 14 populations sauvages de *L. graveolens*, l'extraction et la caractérisation des huiles essentielles ont été réalisées et 70 composants ont été identifiés, représentant 89-99% de la composition totale de l'huile. Ceux-ci peuvent être classés en trois groupes, avec le carvacrol ou le thymol comme composés dominants (plus de 75% de la composition totale de l'huile) et un chémotype non phénolique dominé par les sesquiterpènes oxygénés (Calvo-Irabien, 2018).

La figure 16 montre certains des principaux composés rapportés par différents auteurs chez *Lippia graveolens*.

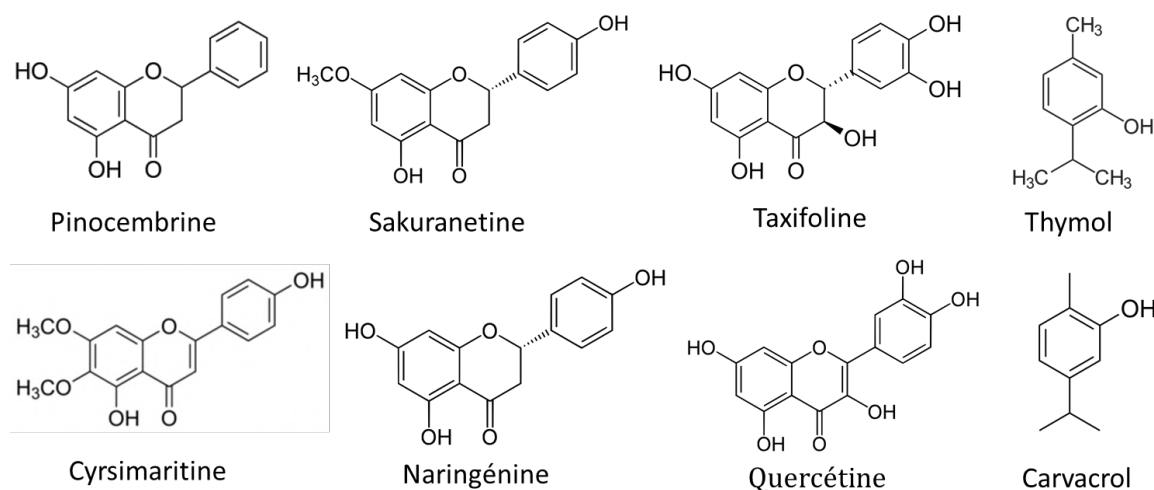


Figure 16. Principaux composés de *Lippia graveolens*.

II.1.4 Activités biologiques associées

Les plantes sélectionnées dans cette étude ont comme point commun d'avoir une activité antioxydante remarquable, en relation avec leur composition chimique et en particulier leur richesse en composés phénoliques. L'action antioxydante de molécules ou d'extraits complexes peut être liée à différents mécanismes d'action et par conséquent intervenir à différents niveaux pour bloquer les ROS. Ainsi cette action « antioxydante » peut être mise en évidence *in vitro* et évaluée par l'aptitude de l'extrait ou de la molécule à capter des radicaux libres, à agir comme réducteur, à réagir avec des espèces oxygénées, par le dosage de marqueurs du stress oxydant (SOD, CAT), par le suivi de radicaux spécifiques (NO•, HOO• etc.), ou par la protection de lipides notamment les acides gras composant les membranes cellulaires. D'autres activités biologiques liées ou non à la capacité à capter des radicaux ont aussi été décrites pour ces trois plantes.

II.1.4.1 Activités antiradicalaires

II.1.4.1.1 *Mimosa tenuiflora*

La présence d'une activité contre les radicaux DPPH a été démontrée et corrélée avec le contenu phénolique d'un extrait hydroéthanolique de l'écorce de *M. tenuiflora* et de ses fractions (hexane, acétate d'éthyle et hydrométhanol). Le contenu phénolique de l'extrait le plus élevé obtenu avec l'extrait méthanolique, présentait également l'activité de piégeage du radical DPPH le plus élevé (IC50=7 mg/L) (Marcel et al., 2016).

La peroxydation lipidique ou lipoperoxydation consiste en la dégradation oxydative des lipides sous l'effet de radicaux ROS (espèces réactives de l'oxygène). Ces réactions en chaîne peuvent être stoppées par des enzymes protectrices telles que la superoxyde dismutase, la catalase et la peroxydase. Il a été montré que l'extrait hydroéthanolique de l'écorce de *M. tenuiflora* présente une inhibition de la lipoperoxydation (Marcel et al., 2016). Les mécanismes d'action ne sont actuellement pas identifiés. Cependant, son activité antiradicalaire peut intervenir dans la protection contre les réactions en chaîne dont les lipides sont le siège.

Cette activité des composés de l'écorce à intervenir dans une cascade de réactions impliquant ces enzymes antioxydantes pourrait avoir un impact sur les champignons aflatoxinogènes. En effet, comme décrit dans la première partie de ce manuscrit, la

production d'aflatoxines est directement liée à la présence de ROS (Roze et al., 2015; F. Tian et al., 2021) et les mêmes enzymes sont utilisées dans la régulation de la biosynthèse des aflatoxines et dans l'étape de terminaison de la lipoperoxydation.

II.1.4.1.2 *Larrea tridentata*

Clark (2003) rapporte que les extraits de *L. tridentata* possèdent une activité antioxydante élevée liée à la présence de flavonoïdes, mais surtout, à l'un des antioxydants les plus puissants produits par les plantes, le NDGA et plusieurs de ses dérivés (Clark, 2003).

Une étude récente a évalué l'activité antioxydante de différents extraits de *L. tridentata* mesurée par cinq méthodes *in vitro* : DPPH, ABTS, superoxyde, activité FRAP, oxyde nitrique. Les valeurs obtenues pour l'extrait hydroéthanolique sont : DPPH à 30 min, IC₅₀ = 111,7 mg/L ; ABTS, IC₅₀ = 8,5 mg/L ; superoxyde IC₅₀ = 0,4 mg/L ; NO IC₅₀ = 230,4 mg/L. En outre, une forte corrélation a été trouvée entre le contenu phénolique et l'activité de piégeage des radicaux libres (Skouta et al., 2018).

Cette étude a été en partie reprise par Sagaste et ses collaborateurs, qui ont également conclu que l'extrait méthanolique de *L. tridentata* présentait une capacité antioxydante élevée. Ils ont montré que cet extrait pouvait augmenter la stabilité oxydative du biodiesel et être employé comme une alternative aux antioxydants synthétiques commerciaux actuellement utilisés dans le biodiesel (Sagaste et al., 2019).

II.1.4.1.3 *Lippia graveolens*

Dans une étude récente, la capacité antioxydante d'extraits hydroéthanoliques d'origan mexicain obtenus dans trois régions différentes du Mexique a été évaluée. Des valeurs de 7,5 à 8,8 et de 1,6 à 1,7 mg équivalent trolox/mL d'extrait ont été obtenues par les méthodes DPPH et ORAC, respectivement. Aucune différence significative n'a été observée entre les trois matières végétales, ce qui indique que la capacité antioxydante dépend peu de l'origine de la plante. Il a également été constaté que l'activité antioxydante (DPPH) mesurée dans les échantillons d'origan mexicain est beaucoup plus élevée que celle rapportée pour l'origan d'Espagne (1,1 mg/mL équivalent trolox) (Cortés-Chitala et al., 2021).

Gonzales et al. (2007) ont évalué la capacité antioxydante de 5 extraits de tige de *L. graveolens* obtenus avec différents solvants (eau, méthanol, acétate d'éthyle) obtenant une IC₅₀ de 31, 2 (mg/L) pour l'extrait aqueux, l'activité antioxydante la plus faible des solvants testés, mais toujours considérée comme forte pour un extrait complexe (Gonzalez et al., 2007).

En plus de leur forte activité antioxydante, les plantes sélectionnées (*M. tenuiflora*, *L. tridentata* et *L. graveolens*), présentent d'autres activités biologiques importantes, certaines communes et d'autres spécifiques à chaque plante.

II.1.4.2 Activités antimicrobiennes

Le tableau 13 présente l'effet inhibiteur des plantes de notre étude sur différentes espèces bactériennes et fongiques ainsi que sur certains parasites.

Tableau 13. Effet inhibiteur de *M. tenuiflora*, *L. tridentata* et *L. graveolens* sur différents microorganismes

Activité antibactérienne			
	Espèce	Extrait	Référence
<i>M. tenuiflora</i>	<i>Escherichia coli</i>	butanol, méthanol, acétate d'éthyle	(Heinrich et al., 1992; Lozoya et al., 1989; Meckes-Lozoya et al., 1990; Padilha et al., 2010)
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	éthanol	(Lozoya et al., 1989)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>		
	<i>Micrococcus luteus</i>		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	(Heinrich et al., 1992)		
<i>L. tridentata</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	éthanol, dichlorométhane	(Brinker, 1993; Castañeda et al., 2001; Lira-Saldívar, 2003; Peñuelas-Rubio et al., 2015; Verástegui et al., 1996)
	<i>Clostridium perfringens</i>		
	<i>Shigela dysenteriae</i>		
	<i>Yersinia enterocolitica</i>		
	<i>Proteus vulgaris</i>		
	<i>Tilletia indica</i>		
	<i>E. atroseptica</i>		
<i>Pseudomonas solanacearum</i>			
<i>L. graveolens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	huile essentielle	(Castellanos-Hernández et al., 2020; Hernandez et al., 2009)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
	<i>Bacillus subtilis</i>		

	<i>Sarcina lutea</i>		
	<i>Shigella boydii</i>		
	<i>Vibrio cholerae</i>		
	<i>Escherichia coli</i>		
	<i>Enterobacter agglomerans</i>		
	<i>Salmonella sp.</i>		
	<i>Enterococcus sp.</i>		
Activité antifongique			
	Espèce	Extrait	Référence
<i>M. tenuiflora</i>	<i>Microsporum canis</i>	éthanol	(Lozoya et al., 1989)
	<i>Microsporum gypseum</i>		
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>		
	<i>Trichophyton rubrum</i>		
	<i>Chaetomium indicum</i>		
	<i>Penicillium oxalicum</i>	(Heinrich et al., 1992)	
	<i>Candida albicans</i>	acétate d'éthyle, éthanol	(Lozoya et al., 1989; Meckes-Lozoya et al., 1990)
<i>L. tridentata</i>	<i>Fusarium</i>	méthanol, éthanol chloroforme acétone	(Brinker, 1993; Castañeda et al., 2001; Lira-Saldívar, 2003; Peñuelas-Rubio et al., 2015; Verástegui et al., 1996)
	<i>Pythium</i>		
	<i>Rhizictinia solani</i>		
	<i>Penicillius citrinum</i>		
	<i>Aspergillus flavus</i>		
	<i>A. parasiticus</i>		
	<i>A. fumigatus</i>		
	<i>A. niger</i>		
	<i>A. oryzae</i>		
	<i>Rhizopus delemar</i>		
	<i>R. nigricans</i>		
	<i>R. oryzae</i>		
	<i>mucor</i>		
	<i>Cytosporina</i>		
	<i>Pythium aphanidermatum</i>		
	<i>Pythium ultimum</i>		
	<i>Cryptococcus albidus</i>		
	<i>C. laurenti</i>		
<i>C. neoformans</i>			
<i>F. oxysporum</i>			
<i>Pythophthora infestans</i>			

	<i>Alternaria solani</i>		
	<i>Alternaria tenuissima</i>		
<i>L. graveolens</i>	Penicillium sp.	éthanol	(Moreno Zuccolotto, 2010)
Activité antiparasitaire			
<i>L. tridentata</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	méthanol eau	(Bashyal et al., 2017)
	<i>Giardia lamblia</i>		
	<i>Naegleria fowleri</i>		(Hernández-Baez et al., 2019)
	<i>Eimeria</i> sp.		
<i>L. graveolens</i>	<i>Giardia intestinalis</i>	eau/éthanol	(Rufino-González et al., 2012)
	<i>Entamoeba histolytica</i>	méthanol	(Quintanilla-Licea et al., 2014)

II.1.4.3 Autres activités biologiques

D'autres activités biologiques spécifiques à ces plantes ont également été décrites dans la littérature.

II.1.4.3.1 *Mimosa tenuiflora*

Selon les connaissances ethnobotaniques, l'écorce de *M. tenuiflora* séchée et réduite en poudre est connue pour être un remède efficace pour traiter les inflammations cutanées (Camargo-Ricalde, 2000). En effet, en 1984 au Mexique, la poudre d'écorce de *M. tenuiflora* a été utilisée de manière empirique pour soulager des brûlures suite à l'explosion d'un réservoir de gaz naturel. La poudre appliquée sur les lésions et les plaies a facilité la régénération de la peau et empêché la formation de cicatrices (Lozoya et al., 1989). Aujourd'hui il existe des formulations commerciales d'écorce de *M. tenuiflora* à visée de protection et régénération dermique. Certaines d'entre elles ont été étudiées pour en vérifier l'effet, comme par exemple, le Mepentol® Leche (Puentes Sánchez et al., 2006). Il a été démontré que les tanins condensés étaient responsables de l'effet curatif des extraits de *M. tenuiflora* (Rivera-Arce, Chávez-Soto, et al., 2007). Cette propriété utilisée en dermatologie et essentiellement imputée à la présence des tanins a été affinée avec l'identification de saponines triterpénoïdes, appelées Mimonosides A - C. Des études *in vivo* ont montré que ces molécules isolées favorisent la prolifération de cellules humaines et peuvent également contribuer au pouvoir curatif de l'écorce (Anton et al., 1993). L'aspect conjoint des tanins et des saponines de *M. tenuiflora* pouvant expliquer l'activité de régénération de la peau dans le cas de brûlures n'a pas été étudié à ce jour.

Une activité anti-inflammatoire a aussi été décrite chez la souris (Marcel et al., 2016) et associée au contenu phénolique de *M. tenuiflora* et à sa capacité antioxydante. Par ailleurs, une autre étude menée par Cruz et al. (2016) a permis d'affiner mieux caractériser l'effet anti-inflammatoire de l'extrait d'écorce de *M. tenuiflora*, et de l'attribuer à la présence d'une flavanone méthoxylée, la sakuranetine (Cruz et al., 2016).

II.1.4.3.2 *Larrea tridentata*

Une grande partie des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, cytotoxiques, antimicrobiennes et inhibitrices de certaines enzymes des extraits de *L. tridentata* a été attribuée à la présence de NDGA (Lira-Saldívar, 2003). Il a notamment été démontré que le NDGA induit l'apoptose de lymphocytes P388, avec une IC50 de 0,66 µg/mL (Bibikova et al., 2017).

L'activité antivirale des métabolites de *L. tridentata* a aussi été clairement détectée dans le travail de Gnabre et al. (1995), où il est établi que l'acide 3-O-méthyl nordihydroguaiaretique (Mal.4) a un effet inhibiteur sur l'activité du virus du SIDA, puisque ce lignane est capable d'inhiber la réplication du virus (J. N. Gnabre et al., 1995). Clark (2003) a démontré les propriétés antivirales de *L. tridentata* contre les virus responsables de différents types d'herpès chez l'homme (HSV-1 et HZV) et mentionne que l'extrait de cette plante est 1000 fois plus puissant que les médicaments antiviraux de synthèse (Acyclovir), en raison d'un effet synergique des flavonoïdes (Clark, 2003).

Gnabre et ses collaborateurs (2015) ont proposé une formulation d'un extrait de *L. tridentata* riche en lignanes et flavonoïdes agissant de manière synergique et ayant une activité anti-cancéreuse équivalente voire supérieure au paclitaxel. Des capsules de cet extrait, comprenant trois classes de composés (des lignanes dibenzylbutanes (sans NDGA mais comprenant M4N et Mal-4), des cyclolignanes très actifs et plusieurs flavonoïdes) ont été formulées pour administration par voie orale et approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) comme cocktail anti-cancéreux et antiviral (J. Gnabre et al., 2015).

Morán-Santibañez et ses collaborateurs en 2019 ont démontré qu'un extrait hydroéthanolique de feuilles de *L. tridentata* a un effet antioxydant, atténuant la cytotoxicité induit par H₂O₂ dans les cellules SH-SY5Y de neuroblastome humain. Ceci est attribué à la diversité et à l'abondance des composés phénoliques présents dans l'extrait. Il exerce donc une activité cytoprotective contre le stress oxydatif *in vitro*, agissant comme

un réactif anti-apoptotique. Cela a permis de proposer cet extrait antioxydant naturel comme une alternative aux approches chimiothérapeutiques des maladies causées par le stress oxydatif (Morán-Santibañez et al., 2019).

Enfin, en 2016, une étude menée sur la sensibilité à l'insuline suggère que l'extrait éthanolique de *L. tridentata* pourrait être utile dans le traitement du diabète de type 2 et pourrait également aider considérablement dans le traitement du syndrome métabolique (Del Vecchio-Tenorio et al., 2016).

II.1.5 Conclusion

La sélection de ces trois plantes est donc basée sur la diversité de leurs applications médicinales depuis l'époque préhispanique au Mexique. Ces applications sont, en grande partie, corrélées à leur composition chimique et notamment leur teneur élevée en polyphénols, ce qui induit une forte activité antioxydante.

De plus, ce choix permet aussi d'étudier l'effet de différents organes des plantes : l'écorce pour *M. tenuiflora* et les feuilles pour *L. tridentata* et *L. graveolens*. Ceci peut permettre d'évaluer l'intérêt de composés phénoliques de nature différents. La comparaison des effets des extraits de chaque plante sur la croissance fongique et la synthèse de l'AFB1 devrait permettre de mieux comprendre le mécanisme d'action mis en jeu et les molécules/propriétés biologiques impliquées.

II.2 Extraction et caractérisation des extraits végétaux

II.2.1 Introduction

L'extraction est l'étape préliminaire de l'étude de l'activité des plantes médicinales et des matrices végétales en général et joue par conséquent un rôle crucial dans l'interprétation des résultats. Les facteurs les plus courants pouvant affecter les processus d'extraction sont : la matrice d'extraction (partie de la plante, taille des particules, composés d'intérêt), la nature du solvant d'extraction, la température, la pression et la durée (Azmir et al., 2013). Les composés bioactifs peuvent être identifiés et caractérisés à partir des extraits obtenus des diverses parties de la plante, telles que les feuilles, les tiges, les fleurs et les fruits. La composition des extraits obtenus sera directement liée à la nature du solvant employé pour générer l'extrait.

Les composés bioactifs présents dans les végétaux peuvent être isolés grâce à différents procédés d'extraction (Loi et al., 2020). Les méthodes d'extraction conventionnelles, comme la macération, l'extraction par solvant ou l'hydrodistillation, sont toujours considérées comme des méthodes de référence et restent les plus utilisées en raison de la facilité d'optimisation de leurs conditions opératoires et de leur transfert possible à l'échelle industrielle (Oreopoulou et al., 2019). Des méthodes non conventionnelles ont été développées ces dernières années. Elles visent à être plus respectueuses de l'environnement en diminuant la dépense énergétique du procédé, à réduire l'utilisation de solvants organiques, à raccourcir la durée du procédé et à améliorer le rendement et la qualité de l'extrait (Azmir et al., 2013).

II.2.1.1 Les méthodes d'extraction

L'extraction solide/liquide aussi appelée lixiviation est une opération unitaire qui est décrite dans le domaine de l'extraction de composés bioactifs comme une extraction par diffusion. Elle repose sur la séparation des composés extractibles présents dans une matrice solide complexe en utilisant l'affinité d'un liquide phase dite solvant (Escribano-Bailon & Santos-Buelga, 2003). Le ou les composants qui sont transférés de la phase solide à la phase liquide sont appelés solutés, tandis que le solide insoluble est appelé inerte.

La diffusion est un phénomène de transport à l'état irréversible et en temps continu qui est essentiel pour le transport de la matière. Du point de vue brownien, si plusieurs

particules sont présentes dans un milieu donné et qu'il n'y a pas de direction préférée pour les oscillations aléatoires, alors sur une période de temps, les particules auront tendance à se répartir uniformément dans tout le milieu. Par conséquent, le résultat final de la diffusion serait une concentration constante de particules dans tout le milieu. Essentiellement, s'il n'y a pas de gradient de concentration, il n'y aura pas de diffusion. Une fois que les particules ont diffusé pour égaliser la concentration partout, le gradient de concentration devient nul et elles ne se déplacent plus dans une direction particulière. Cela signifie qu'au niveau macroscopique, la diffusion se traduit par des particules qui se déplacent des zones de forte concentration vers les zones de faible concentration en raison d'un déplacement des constituants de la matrice végétale vers le solvant, jusqu'à ce que l'équilibre soit atteint (Ibe, 2013). Dans cette perspective, l'extraction par diffusion suppose qu'au cours du processus, il n'y ait pas de dénaturation de la matrice végétale et, par conséquent, que l'intégrité des membranes cellulaires soit maintenue (Cacace & Mazza, 2003). C'est pour cette raison que, pour accélérer l'extraction, l'augmentation de température ou la déstructuration de la matière végétale (broyage, traitement thermomécanique, etc.) est utilisée pour modifier la matrice solide, générant la destruction des membranes ou la rupture de la paroi des cellules.

Même s'il existe de nombreux facteurs qui influencent le processus d'extraction, il existe en général trois processus élémentaires qui régissent l'extraction solide/liquide (Chemat, 2011) (figure 17) :

- Diffusion du solvant dans le solide : il s'agit essentiellement du transport du solvant au sein du solide. Il est affecté par des variables telles que ; l'affinité du solvant avec le soluté, la viscosité du milieu et le rapport de la taille des molécules extractibles aux pores de la matrice solide. Il provoque généralement une proportion plus ou moins importante de gonflement dû au remplissage des cavités végétales.
- Libération de soluté : à cette étape, les liaisons chimiques entre le soluté et la matrice végétale sont rompues, des interactions entre le soluté et le solvant sont générées, il y a transport ou diffusion à travers la membrane. En général, à ce stade, le soluté se dissout dans le solvant. Les facteurs les plus importants à considérer à ce stade sont : l'affinité du soluté pour le solvant et la nature des liaisons chimiques.

- Diffusion du soluté : C'est l'étape finale de l'extraction où s'effectue le transport du soluté à travers le solide et de la périphérie du solide vers le solvant, pour finalement diffuser de manière homogène dans le solvant.

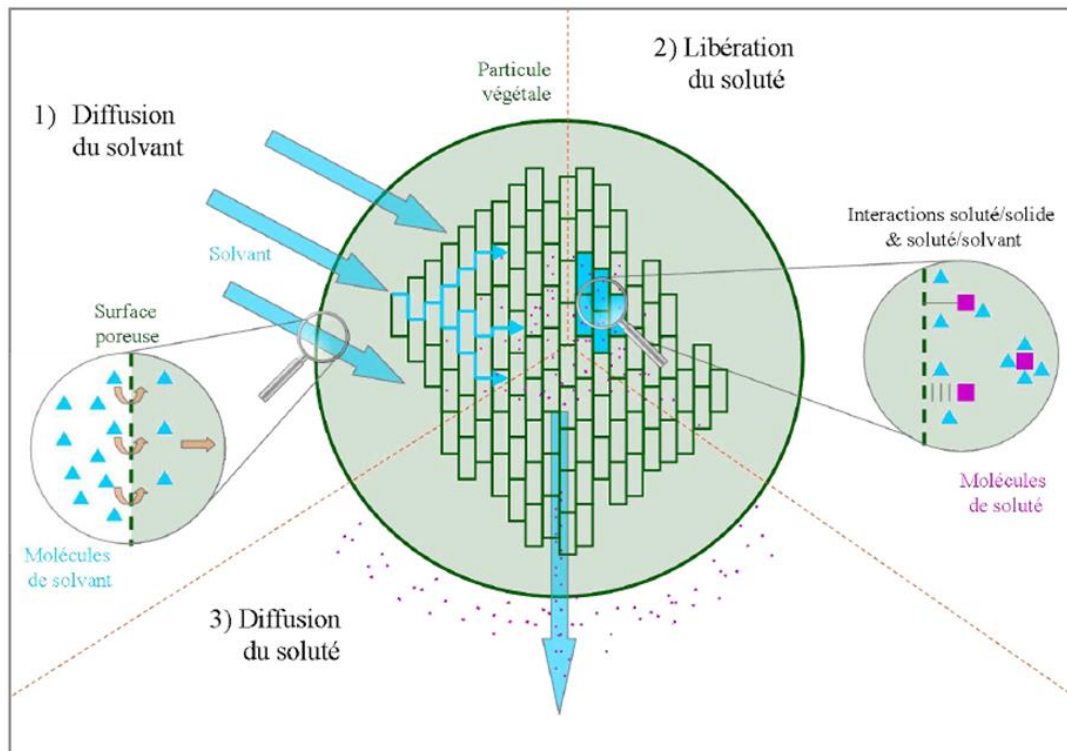


Figure 17. Schéma des trois étapes élémentaires de l'extraction solide/liquide par un solvant dans un solide végétal (Celhay, 2013).

Les méthodes d'extraction conventionnelles basées sur l'extraction solide/liquide sont basées sur la théorie énoncée ci-dessus.

a) Macération

La macération est une technique utilisée depuis l'Antiquité, avant même qu'elle ne soit connue sous ce nom. C'est, depuis longtemps, une technique domestique et peu coûteuse pour la préparation de extraits. La macération est toujours largement utilisée pour l'extraction des composés phénoliques des matières végétales (Srivastava et al., 2021). L'extraction par macération est très simple, mais elle s'accompagne généralement d'étapes complémentaires pour générer l'extrait final. Ainsi, pour augmenter la surface d'échange, le matériel végétal est pré-broyé, ce qui favorise un bon mélange du matériel végétal avec le solvant et augmente la surface de contact. Le processus d'extraction

s'effectue dans un récipient où la matière végétale est mise en contact avec le solvant approprié. La variable la plus importante ici est le choix du solvant, en fonction de son affinité pour les composés d'intérêt. Une variante qui peut être utilisée est d'augmenter la température (lorsque les molécules d'intérêt sont thermorésistantes) pour améliorer le rendement de l'extraction. Cependant, il est courant de réaliser l'extraction à température ambiante. Souvent, la macération est effectuée avec agitation, ce qui facilite l'extraction car : d'une part, cela favorise la diffusion, et d'une autre part, cela sépare la solution concentrée de la surface de l'échantillon en ajoutant un nouveau solvant afin d'augmenter le rendement de l'extraction. Enfin, l'extrait obtenu est filtré pour séparer le résidu solide de l'extrait contenant les composés d'intérêt. Parfois, avant la filtration, une centrifugation est effectuée pour mieux séparer le résidu solide de l'extrait. Le liquide résultant est considéré comme l'extrait (Azmir et al., 2013; Srivastava et al., 2021). Par macération, le processus d'extraction est généralement long, ce qui favorise l'extraction car certains solvants peuvent dégrader les parois cellulaires (Morata et al., 2019). Cependant, ce point peut également être considéré comme un inconvénient du point de vue de l'économie industrielle. Cette technique a été rapportée comme étant très adaptée pour l'extraction des anthocyanes et des tanins. Par contre, dans les processus de vinification, l'extraction excessive des tanins par macération peut être un problème si le processus n'est pas bien contrôlé (Morata et al., 2019).

b) Extraction Soxhlet

L'extraction Soxhlet a été conçue à l'origine pour l'extraction des lipides. Aujourd'hui, elle est utilisée dans un grand nombre d'applications. Il s'agit d'une technique d'extraction exhaustive, qui est largement appliquée aux analytes suffisamment stables thermiquement (Ridgway et al., 2012). Traditionnellement cette méthode est utilisée à partir d'un échantillon solide pour l'extraction de composés à solubilité limitée dans un solvant et en présence d'impuretés insolubles dans le solvant (J. Kim et al., 2012; Nafiu et al., 2017). La méthode Soxhlet a été la méthode la plus utilisée pour l'isolement des composés bioactifs des plantes et la principale méthode de référence pour évaluer la performance de méthodes innovantes (Oreopoulou et al., 2019). Son principal avantage est que l'échantillon est mis en contact de manière répétée avec un solvant « frais », ce qui facilite le déplacement de l'équilibre de transfert (Figure 18) (Nafiu et al., 2017). De plus, le système reste à une température d'extraction relativement élevée en raison de la

chaleur appliquée au ballon de distillation et il n'est pas nécessaire de filtrer à la fin de l'extraction (Luque de Castro & García Ayuso, 2000). Cette méthode est simple et économique, et peut extraire une masse plus importante d'échantillon que les deux autres méthodes conventionnelles. Ses principaux inconvénients résident dans le fait que cette méthode ne peut pas être utilisée pour les composés thermosensibles, car un chauffage prolongé peut entraîner une dégradation des molécules d'intérêt (Nafiu et al., 2017). En outre, cette technique n'est pas sélective (hormis le choix du solvant d'extraction) et des techniques complémentaires de purification ou de concentration sont généralement nécessaires. Les temps d'extraction sont considérés comme longs, généralement entre 3 et 8 heures. Pour augmenter l'efficacité de cette méthode, elle peut être combinée avec l'extraction assistée par micro-ondes et l'extraction par ultrasons (Ridgway et al., 2012).

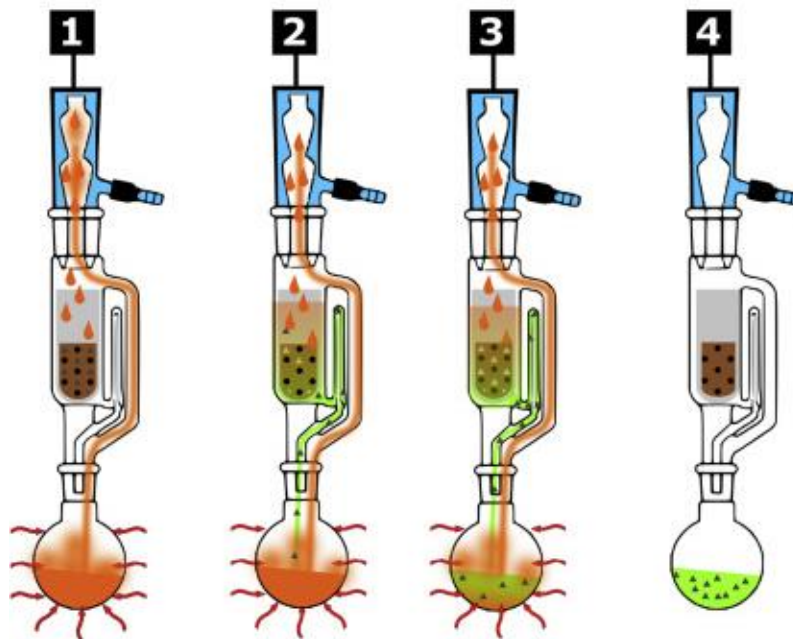


Figure 18. Schéma de processus d'extraction Soxhlet. 1) La matrice solide est placée dans le dé à coudre. Le solvant est chauffé au reflux. 2) Condensation et extraction avec solvant "frais". Les solutés sont transférés de la chambre d'extraction au réservoir. 3) Répétition continue de l'extraction. 4) L'extraction exhaustive est terminée (Weggler et al., 2020).

c) Hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode utilisée principalement pour obtenir des huiles essentielles, dans laquelle les solvants organiques n'interviennent pas. L'hydrodistillation fait intervenir trois processus physico-chimiques principaux : hydrodiffusion, hydrolyse

et décomposition thermique. Lors de l'utilisation d'une température d'extraction élevée, certains composants volatils peuvent être perdus. Cet inconvénient limite son utilisation pour l'extraction de composés thermosensibles (Oreopoulou et al., 2019).

II.2.1.2 Extraction des composés phénoliques

Il existe de nombreuses études sur l'extraction des polyphénols à partir de nombreuses plantes (Azmir et al., 2013; Azwanida, 2015; Dai & Mumper, 2010; Oreopoulou et al., 2019). Tous les auteurs s'accordent à dire que les deux principales méthodes conventionnelles d'extraction des composés phénoliques des plantes médicinales sont : l'extraction Soxhlet et la macération.

Après le choix de la technique d'extraction, une autre variable de la plus haute importance pour l'extraction des polyphénols des plantes est le solvant d'extraction utilisé. Différents solvants ont été utilisés pour l'extraction des polyphénols de différentes plantes. L'efficacité d'un solvant dépend principalement de sa capacité à solubiliser des groupes phénoliques spécifiques (tableau 14). En outre, le solvant peut influencer la perméabilité des cellules végétales par une altération chimique ou biophysique.

Tableau 14. Principaux groupes de composés phénoliques dissous par les solvants d'extraction les plus utilisés

	Eau	Méthanol	Éthanol	Acétone	Acétate d'éthyle
Anthocyanidines	++	++	++	+	+
Acides phénoliques	++	++	++	-	-
Flavonoïdes	+	++	++	++	++
Saponines	++	++	+	-	-
Tanins hydrolysables	++	+	+	-	-
Proanthocyanidines	+	++	++	++	+
Terpénoïdes	+	++	++	++	+
Alcaloïdes	+	++	++	++	
Aglycones	-	-	-	-	+

Adapté de (Oreopoulou et al., 2019; Sathishkumar & Baskar, 2014)

Parmi les solvants fréquemment utilisés, l'eau, solvant vert par excellence, est employée seule ou en mélange, pour extraire différents types de composés phénoliques tels que les anthocyanidines (Cuong et al., 2019), les acides phénoliques et leurs glycosides

(Oreopoulou et al., 2019). Il existe des molécules qui, selon leur degré de polymérisation, peuvent être plus ou moins extractibles selon la polarité du solvant. Par exemple, les tanins sont solubles dans l'eau sous forme de monomère-dimères. Ils sont solubles dans l'éthanol sous forme d'oligomères et, finalement, dans l'acétone et acétate d'éthyle sous forme de polymères

L'utilisation de l'eau comme solvant d'extraction garantit un procédé vert (respectueux de l'environnement), exempt de solvants organiques, facilement transposable à l'échelle industrielle, tant pour son faible coût que pour sa non-toxicité dans les produits destinés à la consommation humaine.

En fonction des conditions d'extraction, les extraits vont donc présenter des compositions singulières, qui vont présenter des caractéristiques et des teneurs variables en composés d'intérêt d'une plante à l'autre. Le choix de la macération aqueuse comme principale technique d'extraction pour ce travail est basé sur le fait que, des deux techniques conventionnelles mentionnées pour l'extraction de composés bioactifs, c'est la seule dans laquelle l'eau peut être utilisée comme solvant d'extraction. La température, comme déjà mentionné, est une variable importante pour améliorer les performances d'extraction, mais elle peut sérieusement affecter les composés thermosensibles. Comme nous ne connaissons pas la nature des composés d'intérêt et leur thermosensibilité, cela renforce l'intérêt de la macération aqueuse. Enfin, la faisabilité d'un transfert d'échelle au niveau industriel a aussi été un argument pour le choix de cette technique d'extraction.

II.2.2 Composition et caractérisation globale de la matière première végétale utilisée

Les plantes étudiées ont été conditionnées et caractérisées avant extraction. Ainsi le teneur en matière sèche, matière minérale et azote organique de l'écorce de *M. tenuiflora*, des feuilles de *L. tridentata*, et des feuilles de *L. graveolens* ont été déterminées. Les procédés de conditionnement et de caractérisation sont décrits dans la partie « Matériel et Méthodes ».

Les résultats obtenus pour ces trois plantes sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15. Teneurs en matière sèche, matière minérale, azote organique, et protéines de *Mimosa tenuiflora*, *Larrea tridentata* et *Lippia graveolens*

Matière première	Teneurs (%)			
	Matière sèche	Matière minérale ^a	Azote organique ^b	Protéines ^c
<i>Mimosa tenuiflora</i>	88,41 ± 0,01	2,31 ± 0,001	1,61 ± 0,03	10,06 ± 0,16
<i>Larrea tridentata</i>	91,20 ± 0,01	9,22 ± 0,001	2,60 ± 0,01	16,25 ± 0,08
<i>Lippia graveolens</i>	90,88 ± 0,01	9,34 ± 0,001	2,07 ± 0,01	12,96 ± 0,03

^a Résidu de combustion, traitement 3h à 550°C., ^b Déterminée par la méthode de dosage Kjeldahl (Kjeldahl, 1883), ^c Facteur multiplicatif k=6,25 (AOAC, 1990). Répétition analyse n=3

Les trois espèces ont un taux d'humidité résiduelle d'environ 10% : *M. tenuiflora* étant le plus humide avec 11,6%, suivi du *L. graveolens* avec 9,9% et du *L. tridentata* avec 8,8% d'humidité. Ces résultats garantissent qu'il n'y aura pas de contamination fongique pendant le stockage des plantes, car les champignons se développent sur le bois lorsque l'humidité est supérieure à 18% (Aleon et al., 2005). A partir des valeurs de matière sèche reportées dans le tableau, tous les résultats présentés dans la suite de ce travail sont calculés sur la base de la teneur en matière sèche.

En ce qui concerne la teneur en matière minérale, une valeur expérimentale de 9,2% a été mesurée pour *L. tridentata*, proche de celle rapportée dans la littérature et comprise entre 9,5% (Garcia, 2012) et 13,7% (Brinker, 1993). Pour *L. graveolens*, une valeur expérimentale de 9,3% a été trouvée pour cette espèce. Elle est similaire à celle rapportée pour d'autres espèces d'origan : 10,2% pour *Poliomintha longiflora* (Ruiz et al., 2009) et 9,0% pour *Lippia berlandieri* (Silva, 1998). On observe que les feuilles de *L. tridentata* et de *L. graveolens* ont une teneur en matière minérale similaire, contrastant avec une teneur quatre fois plus faible pour l'écorce de *M. tenuiflora* (2,3%). Ceci est probablement lié à la différence d'organe de la plante étudiée.

En ce qui concerne la quantité de protéines, pour *M. tenuiflora*, le pourcentage obtenu est légèrement inférieur (10,1%) à celui compris entre 13,3% à 14,4% rapporté dans la littérature pour des échantillons collectés au Brésil (Pereira Filho et al., 2005),

possiblement en raison des différences écologiques des régions de collecte. Pour *L. tridentata*, si la teneur en protéines rapportée dans la littérature est comprise entre 13,9% et 14,5% (Garcia, 2012), celle mesurée dans notre matière première était plus élevée avec 16,3%. Cette teneur élevée est cohérente avec ce qui a été rapporté avec le fourrage de *L. tridentata* considéré comme une source de protéines en alimentation animale (Garcia, 2012; Hernández-Baez et al., 2019). Enfin, *L. graveolens* a une teneur en protéines de 12,96%. Il n'existe pas de données antérieures pour cette espèce, mais cette valeur est similaire à celles rapportées pour d'autres espèces d'origan ; 12,1 pour *Poliomintha longiflora* (Ruiz et al., 2009) et 11,7% pour *Lippia berlandieri* (Silva, 1998).

II.2.2.1 Teneur en fibres de *Mimosa tenuiflora*, *Larrea tridentata* et *Lippia graveolens*

La teneur en fibres des différentes matières premières varie principalement en fonction de la partie de la plante utilisée. Cette teneur peut être mesurée par des dosages gravimétriques différentiels selon la méthode développée par Van Soest et Wine (Van Soest & Wine, 1967). Cette méthode est détaillée dans la section Matériel et Méthodes et les résultats obtenus avec les trois matières premières, sont présentés dans le tableau 16.

Tableau 16. Teneurs en fibres de *Mimosa tenuiflora*, *Larrea tridentata* et *Lippia graveolens*

Matière première	Teneur en fibres (%)			
	Cellulose	Hémicelluloses	Lignines	Total
<i>Mimosa tenuiflora</i> (écorce)	29,6 ± 0,2	8,7 ± 0,3	12,2 ± 0,5	50,5 ± 0,3
<i>Larrea tridentata</i> (feuilles)	12,2 ± 0,2	7,4 ± 0,1	5,5 ± 0,3	23,1 ± 0,2
<i>Lippia graveolens</i> (feuilles)	15,0 ± 0,4	5,1 ± 0,1	7,4 ± 0,2	27,5 ± 0,2

L'écorce du *M. tenuiflora* présente une teneur en fibres totales de 50,5 %, soit deux fois plus que celles obtenues pour le *L. tridentata* (23,1 %) et le *L. graveolens* (27,5 %). Ces résultats étaient prévisibles car, en général, le bois présente une teneur élevée en fibres, tandis que les feuilles ont une teneur plus faible. Ces teneurs en fibres sont une excellente indication de la teneur possible en molécules extractibles. Ainsi, et quel que soit le solvant d'extraction utilisé, on peut s'attendre à un rendement d'extraction plus élevé à partir des feuilles de *L. tridentata* et de *L. graveolens* qu'à partir de l'écorce de *M. tenuiflora*, en raison de la teneur élevée en fibres de cette dernière.

Si le bois peut avoir une teneur en fibres allant jusqu'à 90%, une valeur de 57,3% a été rapportée pour l'écorce de *M. tenuiflora* dans la littérature (E. de Oliveira et al., 2006), ce qui est cohérent avec les 50,5% trouvés dans nos travaux. Cependant, il n'existe pas de données sur la caractérisation de ces fibres. Nos travaux montrent que, dans cette espèce, la teneur en cellulose est de 29,6%, celle en hémicellulose de 8,7% et celle en lignine est de 12,2%.

Pour *L. tridentata* et *L. graveolens*, les teneurs en fibres obtenues sont plus élevées (23,1% et 27,5% respectivement) que celles rapportées dans la littérature (13,4% (Garcia, 2012) et 11% (Silva, 1998) respectivement). Ces deux espèces ont une teneur en cellulose plus élevée que celles en hémicellulose et en lignine. C'est attendu, puisque la cellulose est un composant de base de la paroi cellulaire. Mais l'importance des teneurs en hémicellulose et en lignine est inversée, *L. tridentata* a une teneur plus élevée en hémicellulose (7,4%) que de lignine (5,5%), tandis que *L. graveolens* a plus de lignine (7,4%) que d'hémicellulose (5,1%).

Ce point est intéressant à prendre en considération car les lignines sont issues de la même voie de biosynthèse que les polyphénols. Une revue présente le métabolisme général des phénylpropanoïdes, qui ne se limite pas à la biosynthèse de la lignine, mais inclut une variété d'autres métabolites tels que les flavonoïdes, les coumarines, les tanins hydrolysables, les tanins condensés et bien d'autres. Par conséquent, une teneur plus élevée en lignine peut être liée à une teneur plus élevée en composés phénoliques (Vogt, 2010).

II.2.3 Extractions et caractérisation des extraits de plantes

Les trois plantes ont été extraites par macération pour obtenir des extraits aqueux riches en composés bioactifs, principalement des polyphénols. Les conditions de la macération à l'échelle laboratoire et l'échelle pilote sont présentée dans le tableau 17.

Tableau 17. Conditions d'extraction utilisées pour l'extraction par macération à l'échelle du laboratoire et pilote des trois plantes de l'étude.

Condition	Échelle laboratoire	Échelle pilote
Quantité de matière	3 g	120 g
Volume	0,100 L	4,0 L
Ratio (Liquide/solide)	33,3	33,3
Durée	15 h	
Agitation	Magnétique	Mécanique
Température	Ambiante	

Les polyphénols totaux présents dans les extraits ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Le dosage colorimétrique a été réalisé avec l'acide gallique comme standard : les résultats sont présentés en milligrammes d'équivalent acide gallique (EAG) par g de matière sèche dans l'extrait. Dans le tableau 18, sont présentés les valeurs concernant la matière sèche, le rendement d'extraction et la teneur en polyphénols totaux présents dans les extraits aqueux des trois plantes.

Tableau 18. Masse sèche, rendement d'extraction et teneur en polyphénols totaux des extraits à l'échelle laboratoire et pilote de *Mimosa tenuiflora*, *Larrea tridentata* et *Lippia graveolens*.

Matière première	Rendement d'extraction (%)	Teneur en polyphénols dans l'extrait sec (mg EAG/g de matière sèche dans l'extrait)	Rendement en polyphénols (mg EAG/100 g de plante sèche)
Échelle laboratoire			
<i>Mimosa tenuiflora</i>	9,6 ± 0,01	217,8 ± 21	22,7

<i>Larrea tridentata</i>	22,45 ± 0,82	241,5 ± 13	10,8
<i>Lippia graveolens</i>	18,67 ± 0.05	206,3 ± 3	11,1
Échelle pilote			
<i>Mimosa tenuiflora</i>	11,15	397 ± 22	35,6
<i>Larrea tridentata</i>	25,09	296 ± 12	11,8
<i>Lippia graveolens</i>	23,10	280 ± 30	12,1

Pour les extraits aqueux préparés à l'échelle laboratoire, les rendements d'extraction des différentes matières premières (voir section « Matériel et Méthodes ») sont relativement variables : *M. tenuiflora* présente le rendement le plus faible des trois échantillons, probablement en lien avec sa richesse en fibre (50,3%) en particulier en cellulose (29,6%). De ce fait, les composés extractibles présents en faible quantité peuvent aussi être piégés dans la matrice cellulosique, ce qui limite encore le rendement d'extraction. Les extraits de feuilles de *L. tridentata* et de *L. graveolens* présentent un rendement d'extraction de 22,45% et 18,67% respectivement. Il est intéressant de noter que pour *L. graveolens*, le rendement d'extraction est deux fois supérieur à celui de *M. tenuiflora*, ce qui est directement proportionnel à la teneur en cellulose, *M. tenuiflora* ayant une teneur en cellulose deux fois supérieure à celle de *L. graveolens*. La même corrélation est observée pour *L. tridentata*, confirmant que plus la teneur en cellulose est faible, plus le rendement d'extraction est élevé.

En comparant les rendements d'extraction obtenus avec ceux rapportés dans la littérature, les 11% obtenus pour l'extrait aqueux de *M. tenuiflora* après 15 heures d'extraction sont inférieurs à ceux rapportés pour un extrait éthanolique de l'écorce (16%) (Cruz et al., 2016) et pour un extrait méthanolique après 144 heures de macération (22%) (Meira et al., 2020), mais supérieurs aux 1% rapportés pour un extrait hydroéthanolique (Marcel et al., 2016).

Dans le cas de l'extrait aqueux de *L. tridentata*, un rendement de 22,45% a été obtenu, supérieur au rendement de 14,11% rapporté pour un extrait aqueux, et à celui de 19,65% pour un extrait éthanolique et, par contre, légèrement inférieur au rendement de 24,79% obtenu pour un extrait hydroéthanolique. Ces trois extraits ont été obtenus à 40°C pendant 4 heures suivi d'un temps de repos de 24h à température ambiante (Skouta et al.,

2018). Dans une autre étude, un rendement de 23,2% a été rapporté pour un extrait méthanolique après 72h (Bashyal et al., 2017), ce qui est similaire à celui obtenu dans notre travail.

Pour *L. graveolens*, un rendement de 18,67% a été obtenu, ce qui est supérieur au rendement de 11,09% obtenu pour un extrait aqueux de feuilles séchées de *L. graveolens* mais inférieur à celui de 20,10% obtenu pour un extrait éthanolique par percolation à température ambiante pendant 2 jours (Morales Medina, 2004). Il est également plus élevé que le rendement de 5,44% rapporté pour un extrait éthanolique dans une autre étude (Moreno Zuccolotto, 2010).

D'autre part, nous pouvons observer que la teneur en polyphénols des extraits est similaire dans les 3 extraits aqueux, et comprise entre 206 et 241 mg EAG/g de matière sèche de l'extrait. Cependant, il est probable que la nature des polyphénols obtenus dans les extraits soit différente, en fonction des différentes parties de la plante utilisée.

L'extrait aqueux de *M. tenuiflora* a une teneur totale en polyphénols de 217,8 mg EAG/g MS. Cette teneur est supérieure à celle précédemment rapportée pour un extrait hydroéthanolique d'écorce de *M. tenuiflora* (156 mg EAG/g MS) (Marcel et al., 2016) et inférieure à celle obtenue par macération éthanolique d'écorce de *M. tenuiflora* (360 mg EAG/g MS) (Rivera-Arce, Chávez-Soto, et al., 2007). Cette valeur de polyphénols est supérieure à celle obtenue pour d'autres extraits aqueux d'écorce d'arbres (*Fagus sylvatica* L. (29-57 mg EAG/g MS), *Eucalyptus globulus* (181 mg EAG/g MS), *Quercus* (15 mg EAG/g MS) (Tanase et al., 2019)) obtenus en utilisant différentes méthodes d'extraction (agitation, sonication, extraction assistée par micro-ondes).

Dans le cas de *L. tridentata*, une teneur totale en polyphénols de 241,5 mg EAG/g MS a été obtenue. Elle est supérieure à celle rapportée dans la littérature (115,06 mg EAG/L) pour un extrait aqueux de feuilles séchées de *L. tridentata* et pour un extrait éthanolique (200,23 mg EAG/L) et un obtenu à l'hydroéthanol (212,46 mg EAG/L) (Skouta et al., 2018).

L. graveolens a présenté une teneur totale en polyphénols de 206,3 mg EAG/g DM, soit la plus faible des 3 matières végétales utilisées dans ce travail. Cependant, elle est beaucoup plus élevée que celle rapportée pour les extraits hydroéthanoliques de feuilles de *L. graveolens* collectées dans trois régions différentes du Mexique. Les extraits de l'étude

réalisée par Cortés-Chilata et al. (2021) ont été réalisés par macération à 75°C et agitation électromagnétique et ont montré des teneurs en polyphénols (mesurés par la méthode de Folin-Ciocalteu) de : 96,7, 95,7 et 99,7 mg EAG/ g MS (Cortés-Chitala et al., 2021).

De plus, cette valeur a été comparée à celles rapportées pour d'autres herbes comme le basilic (19,5 mg EAG/g MS), le piment (9,2 mg EAG/g MS), la coriandre (17,3 mg EAG/g MS), l'ail (2,3 mg EAG/g MS), le gingembre (13,7 mg EAG/g MS), la citronnelle (13,6 mg EAG/g MS), le persil (7,0 mg EAG/g MS) et l'origan espagnol (88,5 mg EAG/g MS) (Henning et al., 2011), l'extrait de *L. graveolens* montre une teneur beaucoup plus élevée en polyphénols.

Afin de vérifier si le processus d'extraction est évolutif au niveau industriel et s'il était possible d'obtenir une plus grande quantité de matière pour réaliser tous les essais prévus dans ce travail, des extractions à l'échelle pilote ont aussi été réalisées (tableau 18).

Dans ces essais à l'échelle pilote, le rendement d'extraction et la teneur en polyphénols ont augmenté par rapport aux résultats obtenus dans les extraits à l'échelle laboratoire et ce pour les trois plantes. L'augmentation de l'efficacité de l'extraction peut être liée à l'équipement utilisé (voir la section « matériel et méthodes »). En effet, les ratios liquide/solide ont été conservés, mais l'effet de volume a permis un meilleur contact entre le végétal et le solvant, ce qui peut favoriser la première étape du processus d'extraction (diffusion de solvant dans le solide d'extraction) (Figure 17). La méthode d'agitation utilisée pour les extractions pilotes, utilisant une pale d'agitation, s'avère aussi être plus performante. Tous les autres paramètres d'extraction sont restés constants. Dans la suite du manuscrit, tous les résultats présentés ont été générés en utilisant les extraits pilotes.

II.2.4 Activités biologiques des extraits

Trois activités biologiques ont été mesurées sur les extraits pilotes : activité antioxydante, antifongique et antiaflatoxine.

Tout d'abord, l'activité antioxydante a été mesurée en déterminant l'activité antiradicalaire des solutions par la méthode du 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Cette méthode évalue la capacité d'un mélange de composés à donner des protons H⁺

capables de neutraliser tous les types de radicaux libres. Cette activité s'exprime comme la concentration d'extrait minimale qui est nécessaire pour inhiber de 50% des radicaux DPPH présents dans le milieu réactionnel (IC₅₀ en mg/L). Plus un extrait a une activité anti-radicalaire importante, plus sa valeur d'IC₅₀ est faible.

L'activité antifongique a été déterminée en mettant en contact différentes concentrations de l'extrait à tester avec *A. flavus* sur milieu MEA pendant 7 jours à 27°C. Après incubation, l'effet sur la croissance fongique a été évalué par mesure du diamètre de la colonie fongique en le comparant à celui d'une culture contrôle obtenue dans les mêmes conditions mais sans extrait.

L'activité anti-aflatoxine est déterminée par quantification de la toxine produite après incubation d'*A. flavus* avec différentes concentrations d'extraits pendant 7 jours à 27°C. L'activité anti-mycotoxine a été calculée par comparaison avec la quantité d'AFB1 produite par une culture contrôle préparée dans les mêmes conditions mais sans extrait végétal. Le dosage de l'AFB1 a été réalisé par HPLC couplée à une détection fluorimétrique. Toutes les méthodes utilisées sont détaillées dans la section « *Matériel et Méthodes* ».

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau 19.

Tableau 19. Activité antiradicalaire et antiaflatoxigène des extraits aqueux de *Mimosa tenuiflora*, *Larrea tridentata* et *Lippia graveolens*

Matière première	Activité antiradicalaire IC ₅₀ (mg/L)	Activité antiaflatoxigène IC ₅₀ (mg DM/mL)
<i>Mimosa tenuiflora</i>	10	0,15
<i>Larrea tridentata</i>	24	0,34
<i>Lippia graveolens</i>	30	0,12

L'extrait aqueux de *M. tenuiflora* présente l'activité antioxydante la plus élevée des trois extraits. Si on compare la valeur IC₅₀ de l'activité antioxydante obtenue pour cet extrait (10 mg/L) avec celle de la molécule antioxydante de référence couramment utilisée, le Trolox®, qui est un dérivé synthétique et hydrosoluble de la vitamine E et qui a une IC₅₀ de 3,5 mg/L, on peut conclure que l'extrait de *M. tenuiflora* montre une activité antioxydante très élevée (Muñoz-Acevedo et al., 2011). Ce résultat est cohérent avec les

résultats rapportés dans la littérature, où une IC_{50} d'environ 7 mg/L est rapportée pour les fractions hydroalcooliques de l'écorce de *M. tenuiflora* (Marcel et al., 2016).

Dans le cas de *L. tridentata*, une IC_{50} de 24,2 mg/L a été obtenue. Cette valeur est très inférieure à celles rapportées dans la littérature pour un extrait aqueux (IC_{50} de 572,7 mg/L), un extrait éthanolique (IC_{50} de 135,4 mg/L) ou encore extrait hydroéthanolique (IC_{50} de 111,7 mg/L) (Skouta et al., 2018). Cela s'explique probablement par une teneur plus forte en polyphénols présents dans l'extrait. Enfin, *L. graveolens* présente une IC_{50} de 30 mg/L pour l'activité antioxydante, similaire à l' IC_{50} de 31,8 mg/L rapportée pour un extrait aqueux (Gonzalez et al., 2007).

La figure 19 présente l'effet de concentrations croissantes des extraits aqueux sur la production d'aflatoxines et la croissance de *A. flavus* NRRL 62477, par rapport à une culture témoin sans extrait. Les trois extraits entraînent une inhibition dose-dépendante de la production d'AFB1 avec un effet sur la croissance fongique variable mais en général assez limité.

L'extrait aqueux de *L. tridentata* (figure 19-b) présente la plus forte activité antifongique des trois extraits, une réduction de la croissance de 10% étant observée à la plus forte concentration testée (0,4 mg DM/mL). En parallèle, cet extrait présente la plus faible capacité d'inhibition de l'AFB1 (IC_{50} de 0,34 mg DM/mL) des trois extraits testés.

Dans le cas de l'extrait aqueux de *M. tenuiflora* (figure 19-a) et de *L. graveolens* (figure 19-c), l'inhibition de la croissance fongique est très faible, respectivement 2,87% et 3,48% à la plus forte concentration testée (0,2 mg DM/mL). De plus, aucune relation directe n'est observée entre la dose et le niveau d'inhibition. Enfin, en ce qui concerne l'inhibition de la production d'AFB1, l'extrait aqueux le plus actif est celui de *L. graveolens* avec une IC_{50} de 0,12 mg DM/mL, très proche de *M. tenuiflora* avec une IC_{50} de 0,15 mg DM/mL.

Les trois extraits aqueux testés dans ce travail montrent une réduction de la production d'AFB1 qui dépasse celle rapportée pour d'autres extraits aqueux de plantes qui ont une IC_{50} supérieure à 1,0 mg DM/mL (tableau 9). Ces résultats sont très prometteurs et nous motivent à mieux comprendre les causes de l'effet inhibiteur associé à ces extraits aqueux.

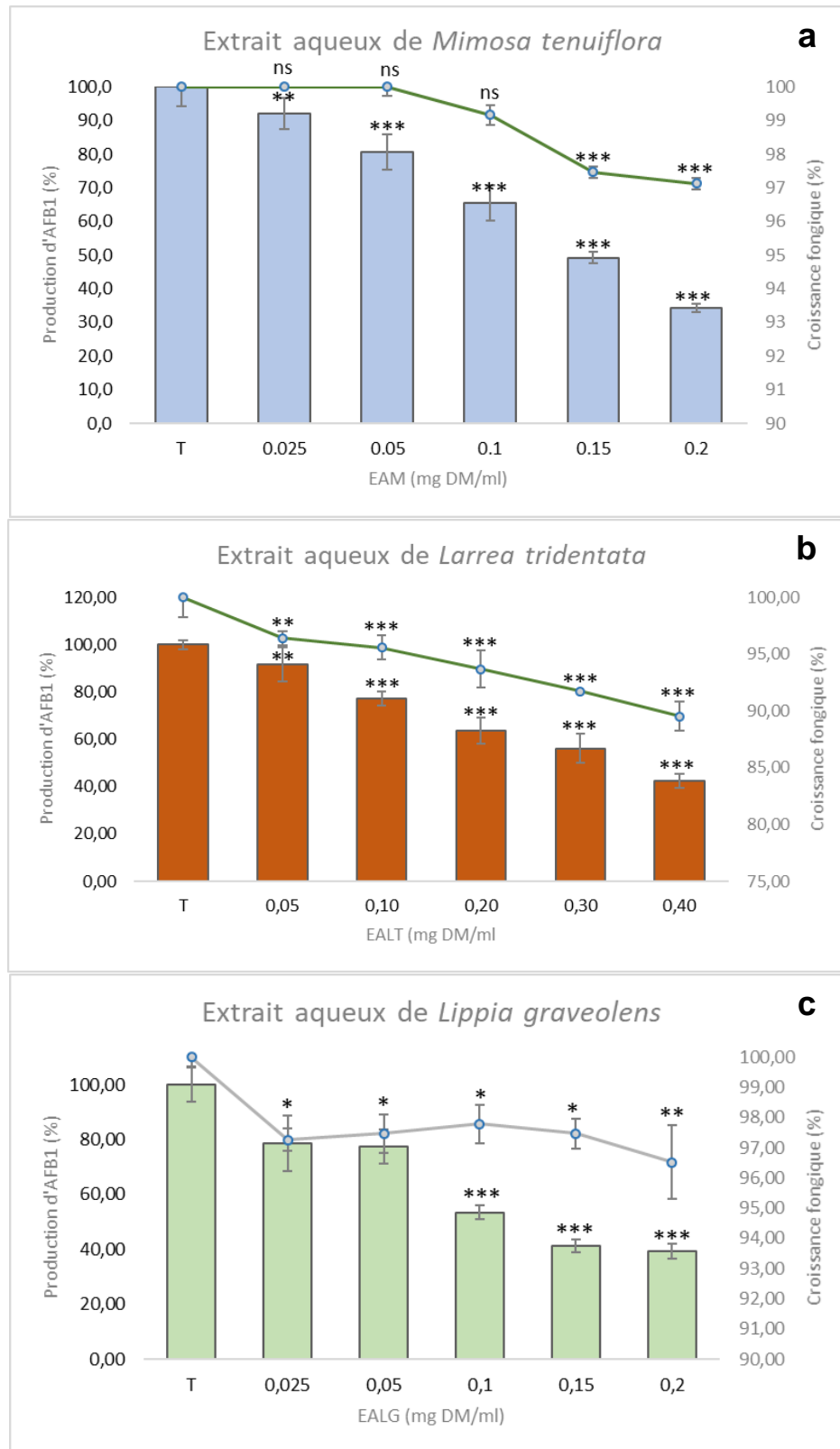


Figure 19. Effet de différentes concentrations des extraits aqueux de *Mimosa tenuiflora* (a), *Larrea tridentata* (b) et *Lippia graveolens* (c) sur la production d'AFB1 et la croissance fongique dans la souche *A. flavus* NRRL 62477. Les résultats sont exprimés en pourcentage de contrôle non traité \pm erreur standard de la moyenne (n = 3). ns = aucun changement statistiquement significatif ; * p-value < 0.1; ** valeur p < 0,01 ; *** Valeur p < 0,001.

II.2.5 Conclusion

Les trois extraits aqueux présentés dans ce chapitre présentent des caractéristiques prometteuses. Le plus important pour ce travail est la capacité de l'extrait à bloquer la synthèse de l'AFB1. À cet égard, les extraits aqueux de *M. tenuiflora* et de *L. graveolens* présentent la plus forte activité. De plus, ces deux extraits n'inhibent pas la croissance fongique. Ce fait est particulièrement intéressant car de tels extraits pourraient bloquer la synthèse de l'AFB1 sans nécessairement altérer l'équilibre fongique de l'écosystème, évitant ainsi la colonisation des substrats par d'autres champignons opportunistes (potentiellement plus nuisibles).

D'autre part, l'activité antioxydante la plus élevée des trois extraits évalués est celle de l'extrait aqueux de *M. tenuiflora*. Inversement, c'est l'extrait aqueux de *L. graveolens* qui présente la plus faible activité antioxydante. Ceci est probablement lié à la teneur en polyphénols totaux dans les extraits. L'extrait aqueux de *M. tenuiflora* présente également la teneur en polyphénols totaux la plus élevée, soit 397 mg EAG/g MS.

De ce fait, il a été décidé de sélectionner l'extrait de *M. tenuiflora* pour une étude plus approfondie. L'objectif principal était d'essayer de déterminer quels sont les principaux composés de l'extrait responsables de l'activité antiaflatoxine et de l'activité antioxydante. Les résultats obtenus sont présentés dans le chapitre suivant.

II.3 Étude des activités biologiques de l'écorce de *M. tenuiflora* en relation avec sa composition chimique

II.3.1 Introduction

Comme il a été décrit dans la première partie de ce manuscrit, certains extraits naturels présentent des effets inhibiteurs contre la production d'aflatoxines par des champignons filamenteux. Dans le chapitre précédent, il a été montré que l'extrait aqueux de *M. tenuiflora* peut inhiber la synthèse de l'AFB1 sans altérer la croissance fongique. En outre, cet extrait contient une quantité élevée de polyphénols totaux et une forte activité antioxydante. Dans la première partie de ce manuscrit, il a également été mentionné que le stress oxydatif est une variable très importante dans la production des aflatoxines. Pour cette raison, il a été décidé dans un premier temps de séparer les différentes familles moléculaires présentes dans l'extrait, afin d'identifier la nature des composés présents dans l'extrait et responsables de l'activité antioxydante. Ensuite, nous avons voulu savoir si ces molécules étaient également responsables de l'inhibition de l'AFB1. Enfin, nous avons tenté d'identifier les molécules responsables de cet effet.

Les extraits aqueux présentés dans le chapitre précédent sont complexes et contiennent une variété de molécules qui nécessitent une séparation pour identifier la fraction active. Il existe différents types de séparation basés sur les particularités physiques ou chimiques des molécules présentes dans l'extrait. La chromatographie est cependant la principale méthode utilisée pour séparer des composés issus d'extraits naturels complexes. Au sein de la chromatographie, il existe un certain nombre de méthodes de séparation, par voie gazeuse ou liquide, dont l'utilisation dépend des propriétés physiques des molécules d'intérêt : température de vaporisation, taille des molécules, charge électrique, polarité, affinité, présence d'atomes/groupements fonctionnels. Par ailleurs les supports de chromatographie peuvent varier de nature pour la phase fixe ; silice, alumine, résines polymériques diverses, et être proposé sous forme de couche mince ou en colonne analytique, préparative, etc. La chromatographie sur colonne, qu'elle soit analytique ou préparative est la méthode la plus couramment employée pour purifier les composés naturels à partir d'un mélange ou d'un extrait complexe (Q.-W. Zhang et al., 2018).

La chromatographie sur colonne d'adsorption est un type de chromatographie liquide largement utilisé pour la séparation des produits naturels, en particulier dans la phase

initiale de séparation, en raison de sa facilité de mise en oeuvre, de la grande capacité et du faible coût des adsorbants utilisés tels que le gel de silice. La séparation est basée sur les différences d'affinité des différentes molécules composant le mélange pour le support, en majorité des résines macroporeuses, permettant ainsi une phase d'adsorption et une phase de désorption. La variable la plus importante pour une bonne séparation des produits naturels dans ce processus est la sélection de l'adsorbant solide (phase stationnaire) et de la phase mobile (Hage, 2018).

Dans l'optique de purifier une grande quantité d'extrait, la chromatographie sur colonne a été utilisée en utilisant l'Amberlite FPX66 comme adsorbant. Cette résine a été choisie pour ses propriétés d'adsorption des molécules de type phénolique et pour son homologation alimentaire. Elle est couramment employée dans l'industrie agroalimentaire pour clarifier et purifier différents extraits et solutions. Dans une étude, cinq résines d'amberlite ont été comparées et il a été démontré que la résine FPX66 est la plus adaptée pour séparer les composés phénoliques tels que les anthocinadines d'un extrait aqueux (Buran et al., 2014).

Par ailleurs, cette résine macroporeuse est composée d'une matrice de polymères aromatiques réticulés avec une surface spécifique de 700 m²/g et une taille de particule de 600-750 µm. Le principe de fractionnement des extraits sur ce type de résine macroporeuse est lié à la capacité de la résine à adsorber les polyphénols d'une solution aqueuse par liaison hydrophobe et empilement aromatique.

La phase d'adsorption est réalisée dans l'eau, ce qui permet aux molécules de type phénolique de l'extrait de s'adsorber dans les différents pores de la résine polymérique, laissant les autres molécules, plus petites et sans affinité pour le polymère, cheminer le long des pores sans être retenues. La désorption est ensuite effectuée en utilisant un solvant pour lequel ces molécules ont plus d'affinité, comme l'éthanol, qui permet donc d'éluer les composés de type phénolique, et de nettoyer la résine pour une purification ultérieure.

Chaque purification sur colonne génère deux types fractions : une fraction aqueuse contenant des sucres, des protéines, et une fraction éthanolique contenant, entre autres, des composés de type phénolique.

Les deux types de fractions ont été caractérisées quant à leur contenu en polyphénols totaux et leur activité antioxydante. Ensuite, les fractions ont été testées pour évaluer leur effet sur la production de l'AFB1 et leur effet antifongique. Enfin, la fraction la plus active a été soumise à une seconde purification afin d'identifier si une famille spécifique de polyphénols, les tanins condensés, était responsable de l'activité.

Par conséquent, l'objectif de ce travail était de caractériser l'effet dose-dépendant de l'extrait aqueux de *M. tenuiflora* et de ses différentes fractions sur la croissance d'*A. flavus*, ainsi que sur la production d'AFB1, afin de déterminer les composés responsables de l'effet antiaflatoxigène.

Ce travail a montré que les tanins condensés sont principalement responsables de l'inhibition de l'AFB1 chez *A. flavus*. L'inhibition de la toxinogénèse est liée à une inhibition de l'expression de *aflR* et *aflS*, les deux régulateurs internes du cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de la toxine. Il a également été démontré que certains gènes impliqués dans la réponse fongique au stress oxydatif sont également affectés par l'extrait de *M. tenuiflora*, probablement en raison de la forte activité antioxydante des tanins condensés présents dans l'extrait.

Ces travaux ont fait l'objet de la publication "*Mimosa tenuiflora* Aqueous Extract : Role of Condensed Tannins in Anti-Aflatoxin B1 Activity in *Aspergillus flavus*", publiée dans le journal *Toxins*.

Certains essais complémentaires ont ensuite été réalisés pour compléter ces travaux.

II.3.2 *Mimosa tenuiflora* Aqueous Extract: Role of Condensed Tannins in Anti-Aflatoxin B1 Activity in *Aspergillus flavus* (*Toxins*, 2021, 13, 391).

Article

Mimosa tenuiflora Aqueous Extract: Role of Condensed Tannins in Anti-Aflatoxin B1 Activity in *Aspergillus flavus*

Christopher Hernandez ^{1,2}, Laura Cadenillas ^{1,2}, Anwar El Maghubi ¹, Isaura Caceres ¹, Vanessa Durrieu ², Céline Mathieu ^{2,3} and Jean-Denis Bailly ^{1,*}

- ¹ Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, EI-Purpan, 31300 Toulouse, France; hernandezhernandezchristopher@gmail.com (C.H.); laura.cadenillas.s@gmail.com (L.C.); anwar.vet2002@gmail.com (A.E.M.); isauracaceres@hotmail.com (I.C.)
- ² Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRA, INPT, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France; vanessa.durrieu@ensiacet.fr (V.D.); celine.mathieu@toulouse-inp.fr (C.M.)
- ³ Centre d'Application et de Traitement des Agro-Ressources (CATAR), INPT, Toulouse, 4 Allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France
- * Correspondence: jd.bailly@envt.fr; Tel.: +33-56-1193-229

Abstract: Aflatoxin B1 (AFB1) is a potent carcinogenic mycotoxin that contaminates numerous crops pre- and post-harvest. To protect foods and feeds from such toxins without resorting to pesticides, the use of plant extracts has been increasingly studied. The most interesting candidate plants are those with strong antioxidative activity because oxidation reactions may interfere with AFB1 production. The present study investigates how an aqueous extract of *Mimosa tenuiflora* bark affects both the growth of *Aspergillus flavus* and AFB1 production. The results reveal a dose-dependent inhibition of toxin synthesis with no impact on fungal growth. AFB1 inhibition is related to a down-modulation of the cluster genes of the biosynthetic pathway and especially to the two internal regulators *aflR* and *aflS*. Its strong anti-oxidative activity also allows the aqueous extract to modulate the expression of genes involved in fungal oxidative-stress response, such as *msnA*, *mtfA*, *atfA*, or *sod1*. Finally, a bio-guided fractionation of the aqueous extract demonstrates that condensed tannins play a major role in the anti-aflatoxin activity of *Mimosa tenuiflora* bark.

Keywords: *Aspergillus flavus*; *Mimosa tenuiflora*; aqueous extract; aflatoxin B1; inhibition; gene expression; condensed tannins

Key Contribution: This study demonstrates the transcriptional inhibition of AFB1 production in *Aspergillus flavus* by an aqueous extract of *Mimosa tenuiflora* bark and shows that condensed tannins play a major role in this phenomenon.



Citation: Hernandez, C.; Cadenillas, L.; Maghubi, A.E.; Caceres, I.; Durrieu, V.; Mathieu, C.; Bailly, J.-D. *Mimosa tenuiflora* Aqueous Extract: Role of Condensed Tannins in Anti-Aflatoxin B1 Activity in *Aspergillus flavus*. *Toxins* **2021**, *13*, 391. <https://doi.org/10.3390/toxins13060391>

Received: 25 March 2021
Accepted: 27 May 2021
Published: 29 May 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Aflatoxins are toxic secondary metabolites produced naturally by various species of the *Aspergillus* genus and in particular by those belonging to the section *Flavi*. *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* attract the most attention of these toxigenic species because they are found in numerous crops where they can produce aflatoxins [1,2]. At least 20 different aflatoxin molecules have been identified, four of them being naturally produced by fungi (AFB1, -B2, -G1, and -G2) and the rest corresponding to metabolites that appear during liver metabolism of the fungal toxins in mammals [3,4].

Aflatoxin B1 (AFB1) is the most important member of this family. This compound is a potent natural carcinogen, classified as a group 1 carcinogenic compound for humans by the International Agency for Research on Cancer [5]. Its main pathogenic route is the induction of hepatocellular carcinoma, a type of cancer with a high mortality rate. This molecule is also teratogenic, genotoxic, and cytotoxic for many types of cells [6,7]. AFB1 is immune-toxic [8], and exposure to it has been closely related to impaired growth in children,

including stunting and wasting [9]. AFB1 contamination is a major problem in tropical and subtropical regions where environmental conditions (temperature and humidity) are optimal for fungal growth and toxin production on crops both pre- and post-harvest. In these regions, seeds (peanuts), cereals (maize, rice), and spices are frequently contaminated with aflatoxins [10,11]. Moreover, global climate change has recently led to the appearance of this toxin in regions where it previously was not found, such as southern and central Europe, and it is feared that AFB1 contamination will continue to increase in these regions in coming years [12,13].

Different strategies are available to reduce AFB1 contamination, ranging from pre-harvest prevention (good agricultural and manufacturing practices) to post-harvest prevention (adequate storage practices and chemical detoxification) [14]. However, according to worldwide surveys, such measures do not completely eliminate AFB1 contamination [15]. Moreover, once AFB1 is produced, it is very difficult to remove it from food commodities or degrade it because it is highly stable, resistant to temperature extremes, and unaffected by most food processing [14,16]. It is therefore vital to find new strategies to limit AFB1 contamination of crops and subsequent exposure of consumers to this carcinogenic agent.

Different alternative strategies are developed to limit AFB1 contamination of foods and feeds. Among them, the use of atoxigenic fungal strains to compete with toxigenic ones is more and more used and different atoxigenic strains or mixtures of strains are now commercially available [17].

The use of natural compounds from plants has also been proposed as a promising alternative strategy to control AFB1 contamination [18]. Numerous studies have shown that extracts of certain herbs, spices, and plants display antifungal and anti-aflatoxigenic activity [19–21]. Plants are one of the richest sources of bioactive compounds, which serve not only to communicate between plants and to protect plants against aggressors such as insects, bacteria, and fungi, but also to combat various external stresses [22]. Polyphenols, alkaloids, and terpenes are three examples of plant secondary metabolites that hinder the production of AFB1 [21]. Many of these bioactive compounds exhibit a high anti-oxidant capacity that is linked to their primary function in the plant [23].

Mimosa tenuiflora (Willd.) Poir. (*Fabaceae* family and *Mimosoideae* subfamily) is a plant endemic of Mexico, known under the common name of “Tepezcohuite” [24,25]. Its bark is widely used in traditional Mexican and Brazilian medicine as an effective remedy to treat skin burns and wounds [24,26]. This plant may be used to reduce venous ulceration [27]; accelerate the healing process [28]; act as an antimicrobial agent against *Staphylococcus aureus* [29], *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, and *Candida albicans* [25]; and regenerate bone [30]. Several studies have isolated and identified the compounds present in different parts of *M. tenuiflora*. Various flavonoids such as sakuranetin (5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavanone), genkwanin (5,4'-dihydroxy-7-methoxyflavone), and sorbifolin (5,6,4'-trihydroxy-7-methoxyflavone) have been identified in the leaves of the plant [31]. Phytoindoles such as yuremamin [32], in addition to saponins and tannins, have been identified in the aqueous extract of *M. tenuiflora* bark [27]. Given that some of the active compounds identified from *M. tenuiflora* are possible antiradical molecules [33] and that oxidative stress is linked to aflatoxin synthesis [34], the present study evaluates the anti-aflatoxigenic activity of aqueous extract of *M. tenuiflora*.

We thus investigate how *M. tenuiflora* stem bark Aqueous Extract (MAE) affects the growth and AFB1 production of *Aspergillus flavus*. The molecular mechanism is investigated by analyzing how MAE affects the expression of several genes from the AFB1 gene cluster and how it affects the gene network involved in both AFB1 regulation and the oxidative stress response in *A. flavus*.

Bio-fractionation was used to identify the active compounds responsible for this effect. The results indicate that the impact on toxin production correlates with total polyphenols, condensed tannins, and the anti-oxidant activity of each fraction.

2. Results and Discussion

2.1. Effect of *M. tenuiflora* Stem Bark Aqueous Extract on Fungal Growth and Aflatoxin B1 Production

2.1.1. Impact on Fungal Growth

Five different concentrations of the MAE [0.025, 0.05, 0.10, 0.15, and 0.20 mg dry matter (DM) per mL] were analyzed and compared with a control culture without an extract to determine how they affect fungal growth. Eight days of incubation in concentrations below 0.15 mg DM/mL of the MAE has no statistically significant impact on the growth of *A. flavus* NRRL 62477. The same incubation period in 0.15 and 0.20 mg DM/mL produces a mild but statistically significant difference in the growth of *A. flavus* NRRL 62477, with a 3% reduction in the growth occurring at the higher concentration (Figure 1).

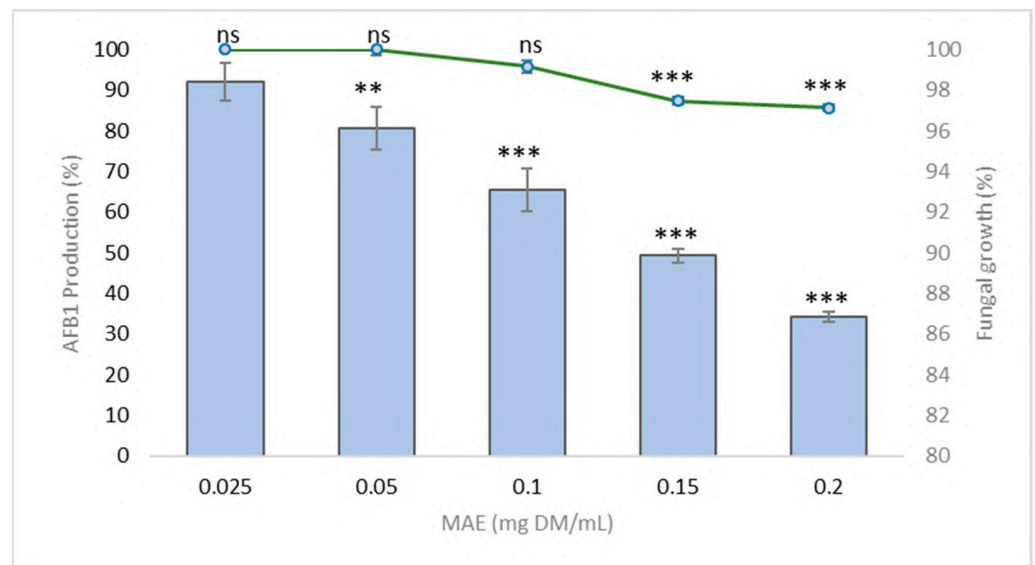


Figure 1. AFB1 production (blue bars) and fungal growth (green line) in *A. flavus* NRRL 62477 strain in various concentrations of MAE. Results are expressed as percentage of untreated control \pm standard error of the mean ($n = 3$). ns = no statistically significant change; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001.

2.1.2. Reduced Production of Aflatoxin B1

Figure 1 shows how the increasing concentration of MAE affects AFB1 production. MAE produces a dose-dependent reduction of AFB1 production in *A. flavus* NRRL 62477. Control cultures of *A. flavus* NRRL 62477 strain led to the production of $5.82 \pm 0.48 \mu\text{g}$ AFB1/mL of culture medium after 8 days at 27°C . This production was reduced to 2.87 ± 0.16 (reduction of 50%) and $2 \pm 0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ (reduction of 66%) when the fungus was exposed to 0.15 and 0.20 mg DM/mL of MAE respectively. This reduction in AFB1 production exceeds that reported for other plant extracts such as essential oils of *Cuminum cyminum* and *Coriandrum sativum*, or aqueous extract of *Micromeria graeca*, which have a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 0.6 to 1.2 mg DM/mL [19,35].

2.1.3. MAE Inhibition of Genes from AFB1 Cluster

AFB1 is the final product of an enzymatic cascade involving more than 20 reactions governed by 27 genes, which are grouped into a cluster and mainly regulated by the transcription factor *aflR* and its co-activator *aflS*. To study how MAE affects *A. flavus*, we evaluated the expression of several genes belonging to the AFB1 cluster. Figure 2 shows that MAE inhibits the expression of AFB1 cluster genes. In fact, the two main internal regulators are down-modulated with fold changes of 1.4 for *aflR* and 1.6 for *aflS* compared with the control. Moreover, gene coding for stable AF-intermediates intervening at the first (*aflC*, *aflD*), middle (*aflL*), and late (*aflO*, *aflP*) stages of the enzymatic cascade is also

hindered by MAE. In contrast, *aflT* is not significantly affected by MAE. This result is consistent with the fact that this gene is not regulated by *aflR* nor *aflS* [36].

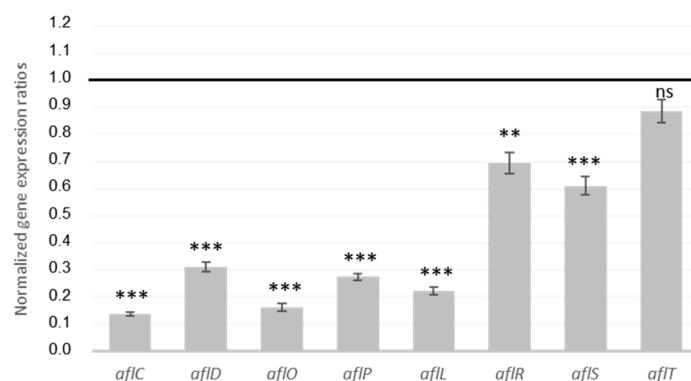


Figure 2. Normalized gene expression ratio for genes from the AFB1 cluster in culture medium with *Mimosa* Aqueous Extract (MAE). Black line indicates level of expression in control medium (i.e., without MAE). ns = no statistically significant change; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001.

The inhibition of *aflR* and *aflS* expression induced by MAE is sufficient to repress the expression of the other genes of the cluster, thereby reducing AFB1 production. Indeed, normal expression of the *aflR* and *aflS* genes is essential to maintain the protein dimer formation necessary to activate most of the genes of the AFB1 cluster [37].

To date, few reports have discussed the use of aqueous extracts as AFB1 inhibitors, so their precise molecular mechanism remains unknown. Nevertheless, several studies have demonstrated that aqueous extracts from plants such as Puer tea or *Micromeria graeca* reduce the AFB1 production of *A. flavus* without significantly affecting fungal growth [19,38]. In these studies, the expressions of the principal aflatoxin gene regulators *aflR* and *aflS* were also downregulated, which is consistent with the present results.

2.1.4. Effect of MAE on Expression of Genes Involved in Oxidative Stress Response

Aflatoxin regulation is a complex process involving an interconnection of several gene networks that are modulated by environmental conditions. In *Aspergilli*, the synthesis of secondary metabolites including AFB1 is closely related with the oxidative stress response [39]. For instance, in *A. flavus* and *A. parasiticus*, a regulatory network of several bZIP transcription factors has been demonstrated to regulate both AFB1 biosynthesis and the oxidative stress response [40,41].

As shown below, MAE produces a strong antiradical activity. Thus, to better understand how it affects the oxidative stress response of *A. flavus*, we analyze how it affects a stress-related gene network. For this purpose, we study gene coding for catalases and superoxide dismutase synthesis (*catA*, *cat2*, *sod1*, *mnSOD*); the global transcription factor *mtfA*; several bZIP transcription factors (*atfA*, *atfB*, *ap-1*); and the genes *srrA* and *msnA*, which participate in the fungal stress response signaling pathway.

As shown in Figure 3, several genes are significantly upregulated upon adding MAE. This includes the conidia-catalase gene *catA*, which is the most impacted factor with an increased expression of 3.14-fold. Other genes have the same behavior; the transcription factors *mtfA*, *atfA*, and *msnA* are over-expressed by 1.64, 1.42, and 1.67 folds, respectively. MAE also induces a significant downregulation of the Cu, Zn superoxide dismutase *sod1*, which is repressed by 1.62-fold. The expression of the other genes investigated (*cat2*, *atfB*, *ap-1*, and *srrA*) is not significantly affected. These results indicate that MAE targets several stress-signaling genes and in particular the transcription factors *mtfA*, *atfA*, and *msnA*, which are upregulated by MAE, thereby inhibiting AFB1 production.

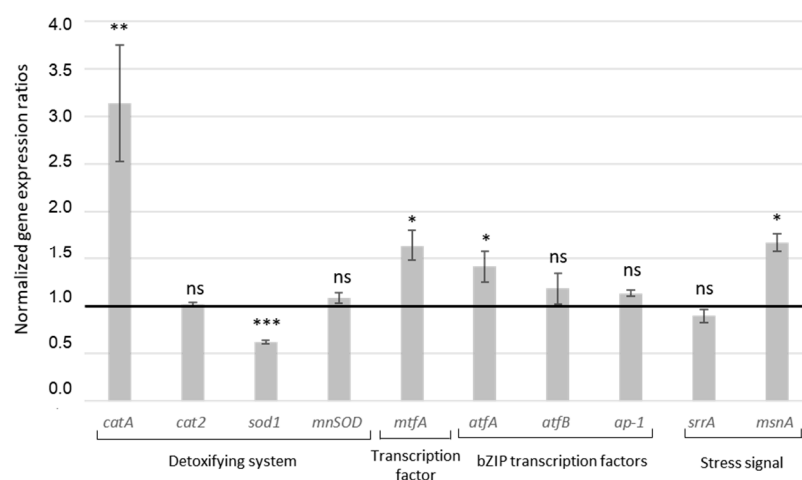


Figure 3. Normalized gene expression ratio for genes involved in oxidative stress response in *A. flavus* and exposed to MAE. Black line represents expression levels of genes in control sample. ns = no statistically significant change; * p -value < 0.05; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001.

Concerning the global regulator *mtfA*, its overexpression has already been linked to decreased levels of *aflR* and thus to AFB1 inhibition in *A. flavus* [42]. Although *atfA* is involved in stress tolerance in several *Aspergilli*, it is also responsible for the expression of *catA* [43,44], which is consistent with the present results. The expression of *catA* is also reportedly governed by the bZIP transcription factor *atfB*, although the present study detects no significant changes in the latter.

Finally, the expression of *msnA*, a gene required to maintain the normal oxidative stress status in *A. flavus* and *A. parasiticus*, is also enhanced. The deletion of *msnA* in both species leads to the accumulation of AFB1 and reactive oxygen species [45]. Moreover, the expression of genes encoding for catalases and superoxide dismutases in *A. flavus* and *A. parasiticus* are also regulated by *msnA* [45]. Thus, in the present study, the enhanced levels of *catA* expression may be partially attributed to the over-expression of *atfA* or to *msnA* levels.

Note that previous studies also reported the over-expression of the transcription factors *msnA* and *mtfA* when AFB1 is inhibited by *M. graeca* and eugenol treatment in *A. flavus* [19,46].

Thus, in the present study, AFB1 production is transcriptionally inhibited by MAE in a process accompanied by an over-expression of the transcription factors involved in fungal stress response (e.g., *mtfA*, *atfA*, and *msnA*). Moreover, the genes *catA* and *sod1* involved in the *A. flavus* anti-oxidant system are also affected by the treatment.

2.2. Fractionation and Characterization of Fractions

To better identify the nature of the anti-AFB1 compounds in MAE, the extract was characterized and fractionated to analyze the activity of the different fractions against AFB1.

2.2.1. Composition

M. tenuiflora bark was used for all the studies reported herein. It contains 88% DM and 12% water and volatile compounds. This dry bark is composed of roughly 50% fibers (29.6% cellulose, 8.7% hemicellulose, and 12.2% lignin), 10% proteins, and 2.3% minerals. Table 1 recapitulates the composition of MAE and the subsequent fractions.

Table 1. Characterization of MAE, F, and Sf.

Purification Step	Mass Proportion of Total Dry Plant (%)	Fraction Step Yield (%DM)	Polyphenols (mg GAE/g DM Extract) ¹	Condensed Tannins (mg/g DM)	Anti-Oxidant Activity on DPPH IC50 (mg/L) ²
Aqueous Extract (MAE)	11.15	11	397 ± 22	171.6 ± 2.8	10
Fraction (F)	1.82	74	551 ± 11	332.3 ± 0.6	9
Subfraction (Sf)	0.10	28	96 ± 2	2.8 ± 0.2	>400 ³

¹ GAE: gallic acid equivalent. ² DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl. Results expressed in terms of IC50, which is the concentration of the extract or the fraction that reduces DPPH radicals by 50%, expressed in milligrams of extract per liter (mg/L). ³ over 400.

After 15 h, the aqueous extraction yields 11% of total dry plant mass, which is lower than previously reported for an ethanol extract of *M. tenuiflora* bark (16%) [31] and for a methanol extract macerated for 144 h (22%) [47]. However, the yield exceeds the 1% yield obtained for a hydroethanol extract of the *M. tenuiflora* bark after maceration for 5 days [33]. These results confirm that extraction conditions affect the results, particularly the solvent polarity but also the temperature and duration. In addition, the variability of the vegetal matter may also contribute to these different yields.

MAE has a total polyphenol content (TPC) of 397 mg gallic acid equivalent (GAE) per gram of DM and 172 mg/g DM of condensed tannins. This TPC is over twofold greater than that previously reported for a hydroethanolic extract of *M. tenuiflora* bark (156 mg GAE/g DM) [33] and falls in the same range as that obtained from ethanolic maceration of *M. tenuiflora* bark (360 mg GAE/g DM) [27].

This TPC also exceeds that obtained from other bark aqueous extracts obtained by various extraction methods (stirring, sonication, microwave-assisted extraction): *Fagus sylvatica* L. (29–57 mg GAE/g DM), *Eucalyptus globulus* (181 mg GAE/g DM), *Quercus* (15 mg GAE/g DM) [48], and *Acacia catechu* (131 mg GAE/g DM) [49].

Condensed tannins are high-molecular-weight polyphenols and are a major compound in barks. They are known to play a role in plant defense systems and to have various biological activities, such as herbivore repellent, antibacterial activity, and antifungal activity [50].

MAE contains 172 mg/g DM of condensed tannins, corresponding to a large proportion of TPC. For comparison, Pycnogenol[®], which is pine maritimus bark extract (known as a reference for high content of condensed tannins), obtained through the Masquelier procedure, was titrated at 700 mg/g DM when extracted under optimal conditions (i.e., a high ethanol: water ratio of 70:30) [51].

To better understand how polyphenols and condensed tannins affect the fungal response (i.e., the growth and AFB1 production), we applied a bio-guided fractionation. The overall fractionation process comprised two successive steps: macroporous absorption resin (MAR) purification leading to fraction F (with a 74% yield) and polyvinylpyrrolidone (PVPP) purification leading to fraction Sf, corresponding to 8% of the MAE. MAR purification was chosen to refine polyphenols, allowing the separation of other hydrophilic compounds (saccharides, organic acids). The following PVPP fractionation isolated non-tannic compounds from precipitated tannins. The large quantity of condensed tannins in the MAE leads to an exceptionally-low-concentration fraction Sf having only 0.1% of DM (see Table 1).

The MAR step produces a gain in TPC of up to 551 mg GAE/g DM in fraction F. After the second step, Sf, corresponding to only 28% of F, contains 96 mg GAE/g DM polyphenols, which mostly corresponds to non-tannic polyphenols. As expected, Sf displays almost no condensed tannins (Figure 4) and much less TPC (85% less compared with F).

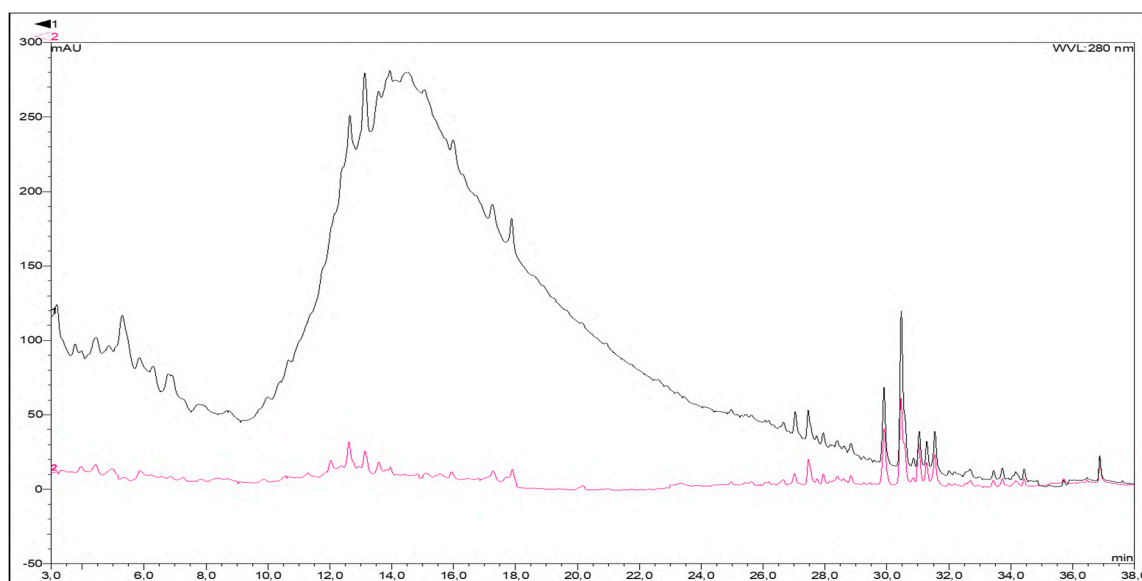


Figure 4. Results of high-performance liquid chromatography UV diode-array detection (HPLC-DAD) at 280 nm of fraction F (black curve) and Sf (red curve) at a concentration of 2 g/L. Compounds were separated in a Kinetex F5 analytical column; mobile phase was methanol and water in 0.1% formic acid, gradient elution, at 35 °C. Chromatographic conditions are reported in Section 4.7.

In parallel, the anti-oxidant activity of MAE and subsequent fractions was evaluated by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical. MAE displays a high anti-oxidative activity, with an IC₅₀ of 10 mg/L. By comparison, Trolox[®], which is commonly used as anti-oxidant reference, has an IC₅₀ of 3.5 mg/L [52]. This result is consistent with the results of Nascimento et al. [33], who obtained an IC₅₀ of about 7 mg/L for hydroalcoholic fractions from *M. tenuiflora* bark. The anti-oxidant activity increases in F (with IC₅₀ varying from 10 to 9 mg/L) due to its higher content of polyphenols but decreases in Sf (IC₅₀ > 400 mg/L) due to the loss of condensed tannins. These results provide additional evidence of the strong anti-oxidant activity responsible for the various biological activities of condensed tannins [53].

2.2.2. Characterization by High-Performance Liquid Chromatography

To better characterize how successive fractionations affect the MAE composition, we used high-performance liquid chromatography UV diode-array detection (HPLC-DAD) to analyze the MAE, F, and Sf. Figure 4 compares the F and Sf chromatograms at 280 nm.

A large peak appears between minutes 8 and 24 in the F chromatogram, which, based on the UV absorption spectrum of tannins, is attributed to tannin absorption [54]. The pattern also appears clearly in the MAE chromatogram (data not shown). The diversity of these oligomeric compounds generates a wide molecular-weight dispersity manifested by non-separated peaks. Moreover, this specific pattern does not appear in the Sf chromatogram after PVPP fractionation (see red curve in Figure 4), confirming the elimination of condensed tannins.

After 26 min, the F and Sf fractions produce essentially the same chromatograms, which is consistent with the presence of small-molecular-weight phenolic compounds in both extracts, only differing by their relative proportions. These compounds may correspond to flavonoids given their specific UV absorption spectra. Note that flavonoids have already been detected in *Mimosa tenuiflora* bark [31].

2.3. Effect of Fractions on Fungal Growth and Aflatoxin B1 Production

2.3.1. Effect of Fractions on Fungal Growth

Fungal growth in five different concentrations of F and Sf (0.025, 0.05, 0.10, 0.15, and 0.20 mg DM/mL) were compared with that in a control culture without extract. After

8 days of incubation for both the control and non-control samples, a slight but statistically significant reduction in growth appears for concentrations above 0.025 mg of DM/mL, with the maximum inhibition for the fungus incubated with 0.2 mg of DM/mL being 5.74% and 3.95% for F and Sf, respectively. Thus, fractionation does not significantly modify the antifungal activity of MAE.

2.3.2. Decreased Production of Aflatoxin B1

To evaluate how phenolic compounds and condensed tannins lead to the anti-aflatoxin activity of MAE, we tested how both F and Sf affect toxin production. Figure 5 shows the results.

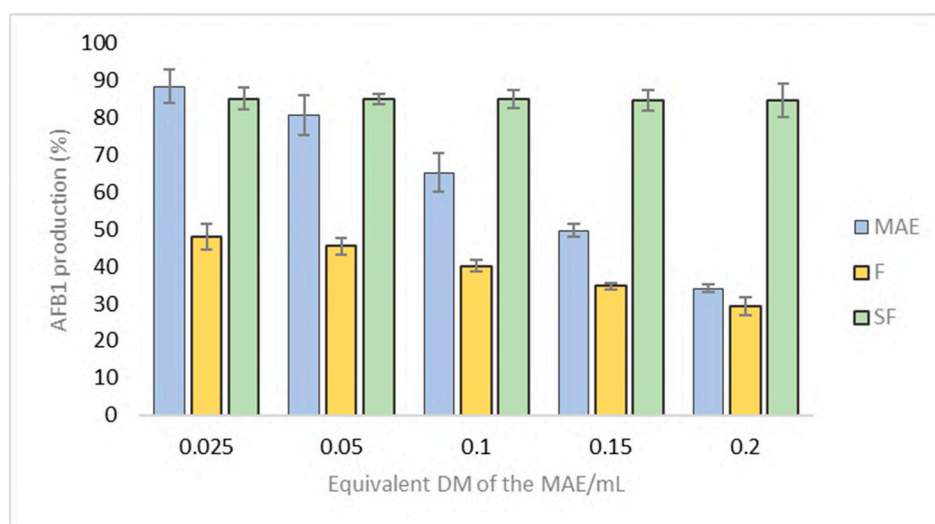


Figure 5. AFB1 production for F (yellow bars) and Sf (green bars) compared with the same for MAE (blue bars). Results are presented in terms of equivalent DM of MAE/Petri dish and expressed as the percentage (%) of AFB1 production compared with untreated control cultures. Histogram shows mean \pm standard error of the mean for four experiments.

The anti-AFB1 activity of F exceeds that of the MAE, with an IC₅₀ of 0.042 mg DM/mL versus 0.15 mg DM/mL for MAE. This may be related to the greater proportion of polyphenols in F than in MAE. In contrast, the anti-AFB1 activity of Sf (IC₅₀ of 0.238 mg DM/mL) is strongly reduced compared with that of MAE. Since this latter contains few condensed tannins, these results suggest that these compounds could be responsible for most of the anti-aflatoxin activity of MAE and F. To better characterize the possible role of condensed tannins in the reduction by MAE and F of AFB1 production, we now study how pure tannins affect toxin production.

2.4. Effect of Condensed Tannins on Fungal Growth and Aflatoxin B1 Production

Five different concentrations (0.025, 0.05, 0.10, 0.15, and 0.20 mg DM/mL) of experimental pine bark condensed tannins (PBCT) were tested to determine how they affect both *A. flavus* growth and AFB1 production.

Eight days of incubation causes a statistically significant reduction in growth for concentrations greater than 0.10 mg of DM/mL. The maximum inhibition is 9.5% after incubation with 0.8 mg condensed tannins/mL.

Figure 6 shows that an increased concentration of condensed tannins (PBCT) inhibits AFB1 production. Over 50% inhibition of AFB1 production compared with the untreated control sample appears after incubation with 0.20 mg tannins/mL. By comparison, at 0.10 and 0.20 mg DM/mL, F produces a similar or even mildly stronger effect on AFB1 production (Figure 6), confirming the importance of condensed tannins in the anti-AFB1 activity of MAE. The effect of tannins on AFB1 production was first described in 1990 by

Azaizeh et al. [55] when they demonstrated that water-soluble tannins contained in kernel coats and cotyledon of peanuts strongly reduce both *A. parasiticus* growth and aflatoxin production. It was also demonstrated that detannin-caffeinated coffee is significantly more sensitive to aflatoxin contamination than regular coffee [56]. More recently, it has also been demonstrated that some condensed tannins (proanthocyanidins) could alleviate AFB1-induced oxidative stress and apoptosis in broilers [57]. In fact, AFB1 and some of its metabolic precursors, such as norsolorinic acid and versicolorins, are highly oxygenated molecules and thus are subjected to redox regulation [58]. It has even been suggested that AFB1 production could be, by itself, part of the fungal response to oxidative stress because AFB1 biosynthesis is activated by high levels of oxidative stress [39]. The potent anti-oxidative activity of tannins present in MAE could therefore lead to a down-modulation of AFB1 synthesis.

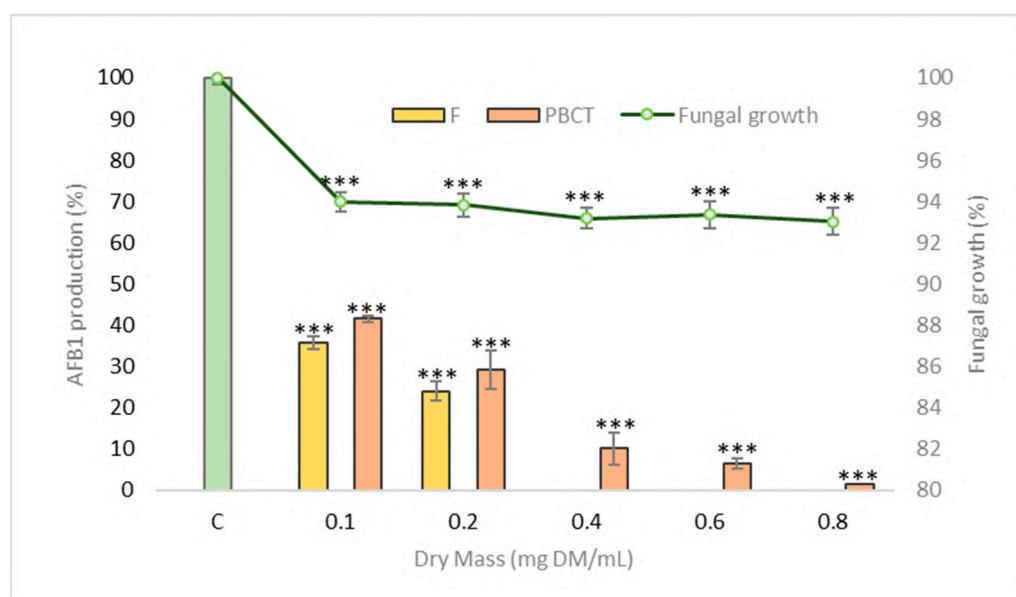


Figure 6. AFB1 production and fungal growth (green line) of *A. flavus* NRRL 62477 strain when exposed to PBCT (pine bark extract, orange bars) compared with exposure to 0.1 and 0.2 mg DM/mL of F (yellow bars). F was not tested at higher concentrations (0.4, 0.6 and 0.8 mg/mL). Results are expressed as a percent of AFB1 production of untreated control \pm standard error of the mean ($n = 4$). *** p -value < 0.001 .

3. Conclusions

This study discusses the anti-AFB1 activity of *Mimosa tenuiflora* bark aqueous extract (MAE). The inhibition of AFB1 production is related to a transcriptional inhibition caused by a downregulation of the genes involved in the biosynthetic pathway, and especially of the two internal regulators *aflR* and *aflS*. Moreover, in *A. flavus*, this response is accompanied by a modulation of the gene coding for the fungal stress response and the anti-oxidant defense system. A bio-guided fractionation of MAE strongly suggests that condensed tannins play a key role in this anti-AFB1 activity related to their strong anti-oxidative capacity. These results allow considering the use of such plant extracts to protect crops from aflatoxin B1 contamination. The interest of an aqueous extract is that it could be used directly in the fields using irrigation systems. Its use on grains during storage will require finding an adequate dry formulation.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

4.1.1. Solvents and Standards

All solvents (hydrochloric acid; Tween 80; chloroform; acetonitrile; formic acid and methanol) and chemicals (polyvinylpyrrolidone; Folin-Ciocalteu reagent; DPPH reagent; AFB1 standard) were purchased from Sigma–Aldrich (St Quentin Fallavier, France) with the exception of ethanol 96% and sodium carbonate purchased from VWR International (Fontenay sous bois, France). The solvents used in this study were HPLC grade. Ultrapure water was prepared using Veolia Purelab Classic (Veolia, Toulouse, France).

4.1.2. Plant Materials

The stem bark of *M. tenuiflora* (Willd.) was purchased from Red Mexicana de Plantas Medicinales y Aromaticas (REDMEXPLAM) and was botanically identified with the registration number UATX/01/Tepezcohuite/2019. The botanical sample was deposited at Jardin Botanico Universitario UAT. Dried stem bark was ground by using a mill equipped with a 1 mm grid, and the powder was stored in plastic bags at 4 °C until use.

4.2. Plant Characterization

Dry matter content was determined by weighing each sample before and after drying in a Memmert oven at 103 °C (Schwabach, Germany) until reaching a constant weight. Mineral content was determined by heating at 550 °C for 6 h. The protein content was determined by applying the Kjeldahl method, as described by Kjeldahl [59]. Nitrogen content was multiplied by 6.25 according to the French standard NF V18-100 (AFNOR). The fiber content (cellulose, hemicellulose, and lignin) was determined by using the ADF–NDF method of Van Soest and Wine with a Tecator Fibertec M1017 (FOSS) [60].

4.3. Preparation of MAE, F, and Sf

4.3.1. Preparation of *M. tenuiflora* Aqueous Extract

A total of 120 g of ground *M. tenuiflora* bark was extracted with 4 L of distilled water under mechanical agitation for 15 h at room temperature. The extract was centrifuged in a sigma 6–16 k centrifuge at 15,000 relative centrifugal field for 15 min (Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Germany) and filtered through Whatman grade 1 filter paper (GE Healthcare Life Sciences, Vélizy-Villacoublay, France). Filtrates were adjusted to 120 mL with distilled water and sterilized in an autoclave at 121 °C for 20 min (SMI group UNICOM, Montpellier, France). The final sterile extract was stored at +4 °C until use. Stock filtrates were diluted to experimental concentrations (2 g/L) with distilled water.

4.3.2. Fractionation of MAE

MAR Fractionation

MAE was fractionated by using microporous adsorption resins (MARs). Fifty grams of the FPX66 adsorbent resin (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, USA) were preconditioned with ultrapure water (pH 5.5) and packed in a cylindrical glass column (ID × L = 3 × 30 cm) equipped with a fritted disk. Two hundred mL of the MAE at 3.245 g DM/L were loaded into the column. Elution was done first with 2BV (bed volume) of ultrapure water to remove sugars and other compounds, following which desorption was done using 1BV of 250 mL of 95% ethanol to release the compounds retained on the resin [61]. The whole process was repeated four times, and the ethanolic fractions were pooled to obtain the fraction (F).

PVPP Fractionation

The fraction F (2.64 g/L) was treated with polyvinylpyrrolidone (PVPP) using the method of Peng et al. (2001) with slight modifications [62]. Five mL of each sample were mixed with 5 mL of water and 500 mg of PVPP. After vortexing for 30 s, the samples were maintained at 4 °C for 15 min and then stirred again for 30 s before being centrifuged

at $3000 \times g$ for 10 min [63]. The supernatant was then collected for further analyses (subfraction Sf).

4.4. Characterization of MAE and Fractions F and Sf

4.4.1. Dry Matter Content

The dry matter content of MAE, F, and Sf was determined as described for *Mimosa* bark.

4.4.2. Total Phenolic Content

The total amount of phenols in MAE and in the fractions was determined by using the Folin-Ciocalteu method adapted from Singleton and Rossi [64]. Briefly, 20 μL of the sample were mixed with 10 μL of Folin-Ciocalteu reagent and 170 μL of sodium carbonate at 2.36% in a 96-well microplate. The absorbance was measured at 700 nm using a BMG-LabtechSpectrostar-Nano spectrophotometer (BMG LABTECH SARL, Champigny s/Marne, France) with a reaction time of 45 min at 45 °C. The results are expressed in milligrams of GAE per gram of dry extract.

4.4.3. Condensed Tannin Content

The condensed tannin content of the samples was determined by using an adaptation of the Waterman and Mole method [65]. Samples were first diluted with water to obtain an absorbance of around 0.2 after hydrolysis. To each 2 mL sample was added 1 mL distilled water and 3 mL of concentrated hydrochloric acid (12 N) in one unheated test tube (control sample) and in one heated test tube. The latter was maintained at 100 °C for 30 min while the control tube was immersed for the same duration in crushed ice. The heated test tube was then recovered and cooled on crushed ice. A volume of 0.5 mL ethanol was added to each tube and the tubes were vortexed for 10 s. The 550 nm absorbance of the control and test samples was recorded by using a Shimadzu UV1800 spectrophotometer (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The tannin concentration was calculated using

$$\text{Tannin (mg/g)} = [0.3866 \times (\text{absorbance}_{\text{sample}} - \text{absorbance}_{\text{control}}) \times \text{dilution factor}] / \text{DM}. \quad (1)$$

Hydrolysis was done in triplicate for each sample, and the results expressed as mg condensed tannin per g DM \pm standard error of the mean.

4.4.4. Radical-Scavenging Activity

The anti-oxidant activity of the extracts was determined by the antiradical activity by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method adapted from Brand-Williams et al. [66]. Briefly, the DPPH reagent (150 μL) was mixed with seven different concentrations of the sample (150 μL), and the absorbance of the mixtures was measured at 516 nm after reacting for 40 min in a BMG-LabtechSpectrostar-Nanospectrophotometer (BMG LABTECH SARL, Champigny s/Marne, France). Measurements were made of five replicates of each sample concentration. The reaction equation is

$$f(Ce)c = 1 - A/A_0, \quad (2)$$

where Ce is the concentration of the extract (in g/L), A is the absorbance of the extract, and A_0 is the absorbance of the blank (DPPH) after reacting for 40 min. The radical-scavenging activity is reported as the half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀), which is the concentration of the extract or fraction that inhibits 50% of the DPPH radicals, expressed in grams of extract per liter (g/L). The calculation of IC₅₀ was done by using linear regression, as follows:

$$\text{IC}_{50} = 0.5 - a/b, \quad (3)$$

where IC₅₀ is the half-maximal inhibitory concentration, a is the origin ordinate, and b is the slope.

4.5. Effect of *M. tenuiflora* Extract and Fractions on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin B1 Synthesis

4.5.1. Fungal Strain and Culture Conditions

The *Aspergillus flavus* strain NRRL 62477 was used for all assays [67]. For all experiments, 1000 spores of *A. flavus* were inoculated centrally into the culture medium using 10 µL of a spore suspension prepared in Tween 80 from a 7-day-old culture (10⁵ spores/mL). The culture medium was composed of 18 mL of malt extract agar (Biokar Diagnostics, Allone, France) and 2 mL of autoclaved *M. tenuiflora* extract or fraction, prepared at five different concentrations by dilution in water. Control cultures were made by adding 2 mL of water to the initial 18 mL of malt extract agar. Cultures were incubated for 8 days at 27 °C. Each assay was done in triplicate. After incubation, the growth was quantified in terms of the measured colony diameter.

4.5.2. Extraction and Quantification of Aflatoxin B1 by HPLC

AFB1 analysis was done as described by El Khoury et al. [19]. In brief, AFB1 extraction was done with 30 mL of HPLC-grade absolute chloroform. Next, supernatants were filtered through a Whatman 1PS phase separator (GE Healthcare Life Sciences, Vélizy-Villacoublay, France). Two milliliters of filtrate were evaporated to dryness in a STUART SBH200D/3 sample concentrator (Stuart equipment, Paris, France) at 45 °C, and the samples were re-solubilized in 2 mL of acetonitrile. Finally, the samples were filtered through 0.45 µm disk filters (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) and placed in HPLC vials. AFB1 was analyzed by using an Ultimate 3000 UPLC (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) with an EvoC18 column (3 µm, 150 × 3.2, Phenomenex, Le Pecq, France) conditioned at 27 °C. The elution program used for separation consisted of forming an isocratic mixture composed of acetonitrile and water (25:75 *v:v*). The mobile phase had a flow rate of 1.2 mL/min. Ten microliters of sample were injected. AFB1 was detected by using a fluorescent detector at 365 (430) nm excitation (emission) wavelengths. The identity of the molecule was confirmed by analyzing the UV absorption spectrum by an additional diode matrix detector (DAD) coupled to the system. AFB1 production levels were calculated based on a standard calibration curve (0.16 to 20 mg/L).

4.6. Effect of *M. tenuiflora* Extract on Gene Expression

4.6.1. Fungal RNA Isolation and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction

The culture conditions for analyzing gene expression were the same as described in Section 4.5.1. A concentration of 18.87 mg/mL of the *M. tenuiflora* extract was chosen and cultures were incubated for 4 days at 27 °C. Sterile cellophane films were used to separate fungal mycelia from media and six biological replicates of each condition were prepared. Fungal RNA was obtained by grounding mycelia under liquid nitrogen and further purified by using a Qiagen RNeasy Plus Minikit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer instructions. The quality and quantity of fungal RNA were respectively determined by gel electrophoresis (1.2% of agarose) and NanoDrop ND1000 (Labtech, Palaiseau, France). A concentration of 300 ng/µL was determined for all analyses. First-strand cDNA synthesis was done by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). We used a 20 µL mixture containing 20 U of RNase inhibitor (Thermo Scientific, Illkirch, France), 4 µL of 5 × reaction buffer, 200 U of RevertAid reverse transcriptase, 2 µL of 10 mM dNTP (Euromedex, Souffelweyersheim, France), 1 µL sterile water, 1 µL oligo (dT) Bys 3' Primer: (5'-GCTGTCAACGATACGCTATAACGGCATGACAGTGTGTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'), and 10 µL of RNA. Reverse transcription conditions were the same as in previous work [46].

4.6.2. q-PCR Conditions and Analysis of Gene Expression

All primer sets have been described previously [46]. The choice of primers used in this study was based on their relation with AFB1 production and the oxidative stress response in *A. flavus*. Experiments were performed in 384-well plates prepared by an Agilent Bravo

Automated Liquid Handling Platform (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Each plate-well contained 2.5 μ L of Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Warrington, UK), 1.5 μ L of each primer set, and 1 μ L of cDNA material. The *q*-PCR experiments were done by using a ViiA7 Real-Time PCR System (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) under conditions adapted from previous work [46]. Gene expression was analyzed by using Quant-Studio Real Time PCR software v1.1 (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), and differences between conditions (control versus treatment) were determined by using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ analysis method [68]. Data were normalized by using the housekeeping gene β -tubulin that was proved to be the most stable reference after analysis with the Normfinder algorithm [69]. All graphics show normalized values, with the control levels set to unity.

4.7. Characterization of Compounds Present in *M. tenuiflora* Extract and Fractions

The HPLC-UV (DAD) analysis was done by using an Ultimate 3000 UPLC (Thermo Fisher, France), which consists of a vacuum degasser, a quaternary pump, an automatic sampler, a temperature-controlled chamber, and a photodiode array detector (DAD), all piloted by a Chromelon chromatography data system (Thermo Fisher, France). The analyses were done in the reverse phase on an F5 column (3 μ m, 150 \times 3.0 mm, Phenomenex, Le Pecq, France). The mobile phase was composed of solvents A and B, which are respectively water with 0.1% formic acid and methanol with 0.1% formic acid. The elution gradient was: 5% (B) in 5 min, 5% to 95% (B) in 45 min, 95% (B) in 5 min, 95% to 5% (B) in 5 min, and initialization at 5% (B) in 5 min. The flow rate was 0.3 mL/min. The analysis was done at 35 °C. The injection volume of the samples was 20 μ L. The solutions to be analyzed were prepared at 2 mg/mL. DAD acquisitions were made in the range 190–450 nm.

4.8. Statistics

The data were analyzed by using a one-way analysis of variance test to determine the differences between the control and treated groups. Differences were considered statistically significant for *p*-values less than 0.05. All data errors are presented as the standard error of the mean.

Author Contributions: Formal analysis and experiments: C.H., L.C., I.C. and A.E.M. Conceptualization: V.D., C.M. and J.-D.B. Methodology: V.D., C.M. and J.-D.B. Supervision of experiments: V.D., C.M. and J.-D.B. All authors participated in writing the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnologia (CONACYT) funded the Ph.D. grant of Christopher Hernandez. French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) funded the Ph.D. grant of Laura Cadenillas. This work was partially funded by AFLAFrance project (ANSES grant EST-19-016).

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Marasas, W.F.O.; Gelderblom, W.; Shephard, G.; Vismer, H. Mycotoxins: A Global Problem. In *Mycotoxins Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade*; CAB International: London, UK, 2008; pp. 29–39. [[CrossRef](#)]
2. Taniwaki, M.H.; Pitt, J.I.; Magan, N. *Aspergillus* Species and Mycotoxins: Occurrence and Importance in Major Food Commodities. *Curr. Opin. Food Sci.* **2018**, *23*, 38–43. [[CrossRef](#)]
3. Amaike, S.; Keller, N.P. *Aspergillus flavus*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **2011**, *49*, 107–133. [[CrossRef](#)]
4. Udomkun, P.; Wiredu, A.N.; Nagle, M.; Müller, J.; Vanlauwe, B.; Bandyopadhyay, R. Innovative Technologies to Manage Aflatoxins in Foods and Feeds and the Profitability of Application—A Review. *Food Control* **2017**, *76*, 127–138. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. IARC. *Fungi Producing Significant Mycotoxins*; IARC: Lyon, France, 2012; pp. 1–30.
6. Caceres, I.; Houry, A.A.; El Houry, R.; Lorber, S.; Oswald, I.P.; Houry, A.E.; Atoui, A.; Puel, O.; Bailly, J.-D. Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. *Toxins* **2020**, *12*, 150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

7. Kemboi, D.C.; Ochieng, P.E.; Antonissen, G.; Croubels, S.; Scippo, M.-L.; Okoth, S.; Kangethe, E.K.; Faas, J.; Doupovec, B.; Lindahl, J.F.; et al. Multi-Mycotoxin Occurrence in Dairy Cattle and Poultry Feeds and Feed Ingredients from Machakos Town, Kenya. *Toxins* **2020**, *12*, 762. [[CrossRef](#)]
8. Meissonnier, G.M.; Pinton, P.; Laffitte, J.; Cossalter, A.-M.; Gong, Y.Y.; Wild, C.P.; Bertin, G.; Galtier, P.; Oswald, I.P. Immunotoxicity of Aflatoxin B1: Impairment of the Cell-Mediated Response to Vaccine Antigen and Modulation of Cytokine Expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2008**, *231*, 142–149. [[CrossRef](#)]
9. Ismail, A.; Gonçalves, B.L.; de Neeff, D.V.; Ponzilacqua, B.; Coppa, C.F.S.C.; Hintzsche, H.; Sajid, M.; Cruz, A.G.; Corassin, C.H.; Oliveira, C.A.F. Aflatoxin in Foodstuffs: Occurrence and Recent Advances in Decontamination. *Food Res. Int.* **2018**, *113*, 74–85. [[CrossRef](#)]
10. Groopman, J.D.; Kensler, T.W.; Wild, C.P. Protective Interventions to Prevent Aflatoxin-Induced Carcinogenesis in Developing Countries. *Annu. Rev. Public Health* **2008**, *29*, 187–203. [[CrossRef](#)]
11. Sarma, U.P.; Bhetaria, P.J.; Devi, P.; Varma, A. Aflatoxins: Implications on Health. *Indian J. Clin. Biochem.* **2017**, *32*, 124–133. [[CrossRef](#)]
12. Bailly, S.; Mahgubi, A.; Carvajal-Campos, A.; Lorber, S.; Puel, O.; Oswald, I.; Bailly, J.-D.; Orlando, B. Occurrence and Identification of *Aspergillus* Section *Flavi* in the Context of the Emergence of Aflatoxins in French Maize. *Toxins* **2018**, *10*, 525. [[CrossRef](#)]
13. Moretti, A.; Pascale, M.; Logrieco, A.F. Mycotoxin Risks under a Climate Change Scenario in Europe. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *84*, 38–40. [[CrossRef](#)]
14. Pankaj, S.K.; Shi, H.; Keener, K.M. A Review of Novel Physical and Chemical Decontamination Technologies for Aflatoxin in Food. *Trends Food Sci. Technol.* **2018**, *71*, 73–83. [[CrossRef](#)]
15. Rodrigues, I.; Naehrer, K. A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed. *Toxins* **2012**, *4*, 663–675. [[CrossRef](#)]
16. Luo, Y.; Liu, X.; Li, J. Updating Techniques on Controlling Mycotoxins—A Review. *Food Control* **2018**, *89*, 123–132. [[CrossRef](#)]
17. Moral, J.; Garcia-Lopez, M.T.; Camiletti, B.X.; Jaime, R.; Michailides, T.J.; Bandyopadhyay, R.; Ortega-Beltran, A. Present Status and Perspective on the Future Use of Aflatoxin Biocontrol Products. *Agronomy* **2020**, *10*, 491. [[CrossRef](#)]
18. Onaran, A.; Yanar, Y. In Vivo and In Vitro Antifungal Activities of Five Plant Extracts Against Various Plant Pathogens. *Egypt. J. Biol. Pest Control* **2016**, *26*, 405–411.
19. El Khoury, R.; Caceres, I.; Puel, O.; Bailly, S.; Atoui, A.; Oswald, I.P.; El Khoury, A.; Bailly, J.-D. Identification of the Anti-Aflatoxinogenic Activity of *Micromeria Graeca* and Elucidation of Its Molecular Mechanism in *Aspergillus flavus*. *Toxins* **2017**, *9*, 87. [[CrossRef](#)]
20. Thippeswamy, S.; Mohana, D.; Umesh, A.; Kiragandur, M. Inhibitory Activity of Plant Extracts on Aflatoxin B1 Biosynthesis by *Aspergillus Flavus*. *J. Agric. Sci. Technol.* **2014**, *16*, 1123–1132.
21. Loi, M.; Paciolla, C.; Logrieco, A.F.; Mulè, G. Plant Bioactive Compounds in Pre- and Postharvest Management for Aflatoxins Reduction. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 243. [[CrossRef](#)]
22. Mithöfer, A.; Maffei, M. General Mechanisms of Plant Defense and Plant Toxins. In *Plant Toxins*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2017; ISBN 978-94-007-6463-7.
23. Pisoschi, A.M.; Pop, A.; Cimpeanu, C.; Predoi, G. Antioxidant Capacity Determination in Plants and Plant-Derived Products: A Review. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, *2016*, 9130976. [[CrossRef](#)]
24. Camargo-Ricalde, S.L. Descripción, distribución, anatomía, composición química y usos de *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae) en México. *Rev. Biol. Trop.* **2000**, *48*, 939–954.
25. de Souza, R.S.O.; de Albuquerque, U.P.; Monteiro, J.M.; de Amorim, E.L.C. Jurema-Preta (*Mimosa Tenuiflora* [Willd.] Poir.): A Review of Its Traditional Use, Phytochemistry and Pharmacology. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2008**, *51*, 937–947. [[CrossRef](#)]
26. Lozoya, X.; Navarro, V.; Arnason, J.T.; Kourany, E. Experimental Evaluation of *Mimosa Tenuiflora* (Willd.) Poir. (Tepescohuite) I. Screening of the Antimicrobial Properties of Bark Extracts. *Arch. Investig. Med.* **1989**, *20*, 87–93.
27. Rivera-Arce, E.; Chávez-Soto, M.A.; Herrera-Arellano, A.; Arzate, S.; Agüero, J.; Feria-Romero, I.A.; Cruz-Guzmán, A.; Lozoya, X. Therapeutic Effectiveness of a *Mimosa Tenuiflora* Cortex Extract in Venous Leg Ulceration Treatment. *J. Ethnopharmacol.* **2007**, *109*, 523–528. [[CrossRef](#)]
28. Shrivastava, R. Clinical Evidence to Demonstrate That Simultaneous Growth of Epithelial and Fibroblast Cells Is Essential for Deep Wound Healing. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **2011**, *92*, 92–99. [[CrossRef](#)]
29. Padilha, I.Q.M.; Pereira, A.V.; Rodrigues, O.G.; Siqueira-Júnior, J.P.; do Socorro, V. Pereira, M. Antimicrobial Activity of *Mimosa Tenuiflora* (Willd.) Poir. from Northeast Brazil against Clinical Isolates of *Staphylococcus Aureus*. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2010**, *20*, 45–47. [[CrossRef](#)]
30. Martel-Estrada, S.A.; Olivas-Armendáriz, I.; Santos-Rodríguez, E.; Martínez-Pérez, C.A.; García-Casillas, P.E.; Hernández-Paz, J.; Rodríguez-González, C.A.; Chapa-González, C. Evaluation of in Vitro Bioactivity of Chitosan/*Mimosa Tenuiflora* Composites. *Mater. Lett.* **2014**, *119*, 146–149. [[CrossRef](#)]
31. Cruz, M.P.; Andrade, C.M.F.; Silva, K.O.; de Souza, E.P.; Yatsuda, R.; Marques, L.M.; David, J.P.; David, J.M.; Napimoga, M.H.; Clemente-Napimoga, J.T. Antinoceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract, Fractions and Flavones Isolated from *Mimosa Tenuiflora* (Willd.) Poir. (Leguminosae). *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150839. [[CrossRef](#)]
32. Vepsäläinen, J.; Auriola, S.; Tukiainen, M.; Ropponen, N.; Callaway, J. Isolation and Characterization of Yuremamine, a New Phytoindole. *Planta Med.* **2005**, *71*, 1053–1057. [[CrossRef](#)]

33. Nascimento, M.S.; Paiva-Souza, I.O.; Fernandes, X.A.; da C. de Moraes, S.Z.; Araujo, S.S.; Shan, A.Y.K.V.; Camargo, E.A.; Santana, A.E.G.; Araujo, B.S.; Estevam, C.S. Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Hydroethanol Extract and Fractions of the Bark of *Mimosa Tenuiflora* (Willd.) Poir. *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* **2016**, *10*, 823–831. [[CrossRef](#)]
34. Caceres, I.; El Khoury, R.; Bailly, S.; Oswald, I.P.; Puel, O.; Bailly, J.-D. Piperine Inhibits Aflatoxin B1 Production in *Aspergillus Flavus* by Modulating Fungal Oxidative Stress Response. *Fungal Genet. Biol.* **2017**, *107*, 77–85. [[CrossRef](#)]
35. Ben Miri, Y.; Djenane, D. Evaluation of Protective Impact of Algerian *Cuminum Cyminum* L. and *Coriandrum Sativum* L. Essential Oils on *Aspergillus Flavus* Growth and Aflatoxin B1 Production. *Pak. J. Biol. Sci.* **2018**, *21*, 67–77. [[CrossRef](#)]
36. Chang, P.-K.; Yu, J.; Yu, J.-H. AflT, a MFS Transporter-Encoding Gene Located in the Aflatoxin Gene Cluster, Does Not Have a Significant Role in Aflatoxin Secretion. *Fungal Genet. Biol.* **2004**, *41*, 911–920. [[CrossRef](#)]
37. Kong, Q.; Chi, C.; Yu, J.; Shan, S.; Li, Q.; Li, Q.; Guan, B.; Nierman, W.C.; Bennett, J.W. The Inhibitory Effect of *Bacillus Megaterium* on Aflatoxin and Cyclopiazonic Acid Biosynthetic Pathway Gene Expression in *Aspergillus Flavus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 5161–5172. [[CrossRef](#)]
38. Mo, H.Z.; Zhang, H.; Wu, Q.H.; Hu, L.B. Inhibitory Effects of Tea Extract on Aflatoxin Production by *Aspergillus Flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2013**, *56*, 462–466. [[CrossRef](#)]
39. Grintzalis, K.; Vernardis, S.I.; Klapa, M.I.; Georgiou, C.D. Role of Oxidative Stress in Sclerotial Differentiation and Aflatoxin B1 Biosynthesis in *Aspergillus Flavus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 5561–5571. [[CrossRef](#)]
40. Hong, S.-Y.; Roze, L.V.; Wee, J.; Linz, J.E. Evidence That a Transcription Factor Regulatory Network Coordinates Oxidative Stress Response and Secondary Metabolism in *Aspergilli*. *Microbiologyopen* **2013**, *2*, 144–160. [[CrossRef](#)]
41. Guan, X.; Zhao, Y.; Liu, X.; Shang, B.; Xing, F.; Zhou, L.; Wang, Y.; Zhang, C.; Bhatnagar, D.; Liu, Y. The BZIP Transcription Factor Afap1 Mediates the Oxidative Stress Response and Aflatoxin Biosynthesis in *Aspergillus Flavus*. *Rev. Argent. Microbiol.* **2019**, *51*, 292–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Zhuang, Z.; Lohmar, J.M.; Satterlee, T.; Cary, J.W.; Calvo, A.M. The Master Transcription Factor MtfA Governs Aflatoxin Production, Morphological Development and Pathogenicity in the Fungus *Aspergillus Flavus*. *Toxins* **2016**, *8*, 29. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Balázs, A.; Pócsi, I.; Hamari, Z.; Leiter, E.; Emri, T.; Miskei, M.; Oláh, J.; Tóth, V.; Hegedus, N.; Prade, R.A.; et al. AtfA BZIP-Type Transcription Factor Regulates Oxidative and Osmotic Stress Responses in *Aspergillus Nidulans*. *Mol. Genet. Genom. MGG* **2010**, *283*, 289–303. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hagiwara, D.; Takahashi, H.; Kusuya, Y.; Kawamoto, S.; Kamei, K.; Gono, T. Comparative Transcriptome Analysis Revealing Dormant *Conidia* and Germination Associated Genes in *Aspergillus* Species: An Essential Role for AtfA in Conidial Dormancy. *BMC Genom.* **2016**, *17*, 358. [[CrossRef](#)]
45. Chang, P.-K.; Scharfenstein, L.L.; Luo, M.; Mahoney, N.; Molyneux, R.J.; Yu, J.; Brown, R.L.; Campbell, B.C. Loss of MsnA, a Putative Stress Regulatory Gene, in *Aspergillus Parasiticus* and *Aspergillus Flavus* Increased Production of *Conidia*, Aflatoxins and Kojic Acid. *Toxins* **2011**, *3*, 82–104. [[CrossRef](#)]
46. Caceres, I.; El Khoury, R.; Medina, Á.; Lippi, Y.; Naylies, C.; Atoui, A.; Khoury, A.E.; Oswald, I.P.; Bailly, J.-D.; Puel, O. Deciphering the Anti-Aflatoxinogenic Properties of Eugenol Using a Large-Scale q-PCR Approach. *Toxins* **2016**, *8*, 123. [[CrossRef](#)]
47. Meira, C.L.C.; Novaes, C.G.; Novais, F.C.; De Jesus, V.D.; De Oliveira, D.M.; Aguiar, R.M. Application of Principal Component Analysis for the Evaluation of the Chemical Constituents of *Mimosa Tenuiflora* Methanolic Extract by DLLME/GC–MS. *Microchem. J.* **2020**, *152*, 104284. [[CrossRef](#)]
48. Tanase, C.; Coşarcă, S.; Muntean, D.-L. A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules* **2019**, *24*, 1182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Kumar, R.; Mahey, S.; Arora, R.; Mahajan, J.; Kumar, V.; Arora, S. Insights into Biological Properties of Less Explored Bark of Industrially Important *Acacia Catechu* Willd. *Ind. Crops Prod.* **2019**, *138*, 111486. [[CrossRef](#)]
50. Ullah, C.; Unsicker, S.B.; Reichelt, M.; Gershenson, J.; Hammerbacher, A. Accumulation of Catechin and Proanthocyanidins in Black Poplar Stems After Infection by *Plectosphaerella Populi*: Hormonal Regulation, Biosynthesis and Antifungal Activity. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Blumenthal, M.; Oliff, H. Scientific and Clinical Monograph for Pycnogenol. *Am. Bot. Counc.* **2010**, *1*, 2–23.
52. Muñoz-Acevedo, A.; Méndez, L.Y.V.; Stashenko, E.E.; Kouznetsov, V.V. Improved Trolox[®] Equivalent Antioxidant Capacity Assay for Efficient and Fast Search of New Antioxidant Agents. *Anal. Chem. Lett.* **2011**, *1*, 86–102. [[CrossRef](#)]
53. De la Iglesia, R.; Milagro, F.I.; Campión, J.; Boqué, N.; Martínez, J.A. Healthy Properties of Proanthocyanidins. *BioFactors* **2010**, *36*, 159–168. [[CrossRef](#)]
54. Jerez, M.; Tourino, S.; Sineiro, J.; Torres, J.; Núñez, M. Procyanidins from Pine Bark: Relationships between Structure, Composition and Antiradical Activity. *Food Chem.* **2007**, *104*, 518–527. [[CrossRef](#)]
55. Azaïzeh, H.A.; Pettit, R.E.; Sarr, B.A.; Phillips, T.D. Effect of Peanut Tannin Extracts on Growth of *Aspergillus Parasiticus* and Aflatoxin Production. *Mycopathologia* **1990**, *110*, 125–132. [[CrossRef](#)]
56. Hasan, H.A. Aflatoxin in Detannin Coffee and Tea and Its Destruction. *J. Nat. Toxins* **2002**, *11*, 133–138.
57. Rajput, S.A.; Zhang, C.; Feng, Y.; Wei, X.T.; Khalil, M.M.; Rajput, I.R.; Baloch, D.M.; Shaukat, A.; Rajput, N.; Qamar, H.; et al. Proanthocyanidins Alleviates AflatoxinB₁-Induced Oxidative Stress and Apoptosis through Mitochondrial Pathway in the Bursa of Fabricius of Broilers. *Toxins* **2019**, *11*, 157. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

58. Narasaiah, K.V.; Sashidhar, R.B.; Subramanyam, C. Biochemical Analysis of Oxidative Stress in the Production of Aflatoxin and Its Precursor Intermediates. *Mycopathologia* **2006**, *162*, 179–189. [[CrossRef](#)]
59. Bradstreet, R.B. Kjeldahl Method for Organic Nitrogen. *Anal. Chem.* **1954**, *26*, 185–187. [[CrossRef](#)]
60. Soest, P.J.V.; Wine, R.H. Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **1967**, *50*, 50–55. [[CrossRef](#)]
61. Buran, T.J.; Sandhu, A.K.; Li, Z.; Rock, C.R.; Yang, W.W.; Gu, L. Adsorption/Desorption Characteristics and Separation of Anthocyanins and Polyphenols from Blueberries using Macroporous Adsorbent Resins. *J. Food Eng.* **2014**, *128*, 167–173. [[CrossRef](#)]
62. Peng, Z.; Hayasaka, Y.; Iland, P.G.; Sefton, M.; Høj, P.; Waters, E.J. Quantitative Analysis of Polymeric Procyanidins (Tannins) from Grape (*Vitis Vinifera*) Seeds by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 26–31. [[CrossRef](#)]
63. Mbacke DIENG, S.I.; Mathieu, C.; Sarr, A.; Diatta-Badji, K.; Fall, A.D. Condensed Tannins Content and Their Influence on the Antioxidant Activity of Bark Hydroethanol Extract of *Piliostigma Reticulatum* (Dc) Hochst and Its Fractions. *Pharmacogn. J.* **2020**, *12*, 361–368. [[CrossRef](#)]
64. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
65. Waterman, P.G.; Mole, S. *Analysis of Phenolic Plant Metabolites*; Blackwell Scientific: Oxford, UK; Boston, MA, USA, 1994; ISBN 978-0-632-02969-3.
66. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
67. El Mahgubi, A.; Puel, O.; Bailly, S.; Tadriss, S.; Querin, A.; Ouadia, A.; Oswald, I.P.; Bailly, J.D. Distribution and Toxigenicity of *Aspergillus Section Flavi* in Spices Marketed in Morocco. *Food Control* **2013**, *32*, 143–148. [[CrossRef](#)]
68. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Orntoft, T.F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5245–5250. [[CrossRef](#)]

II.3.3 Etudes complémentaires de la composition du *Mimosa tenuiflora*

En parallèle des résultats déjà présentés dans l'article, des études ont été menées pour comprendre la nature des composés extractibles dans l'écorce de *Mimosa tenuiflora*, ainsi que pour identifier par HPLC-MS certains composés présents dans les extraits et tenter de les corrélés avec les activités biologiques mises en évidence dans l'article.

II.3.3.1 Extractions avec une gamme de solvants

L'investigation des composés de polarité très différentes a été poursuivie avec l'objectif de classer les composés présents dans la matière végétale en fonction de leur polarité pour tenter d'identifier la nature des composés actifs. L'extraction des composés de l'écorce de *M. tenuiflora* a été réalisée par extraction au soxhlet avec trois solvants de polarité décroissante (tableau 20). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 21.

Tableau 20. Indice de polarité et constante diélectrique des solvants utilisés – d'après (Snyder, 1968).

Solvant	Indice de polarité	Constante diélectrique
Méthanol	0,99	33
Acétate d'éthyle	0,58	6
Cyclohexane	0,04	2

Tableau 21. Rendement d'extraction et masse sèche des extraits obtenus par la méthode soxhlet avec différents solvants à partir de l'écorce de *M. tenuiflora*.

Plante	Solvant d'extraction	% MS de l'extrait	Rendement d'extraction (%)
<i>M. tenuiflora</i>	Méthanol	1,29 ± 0,01	31,21 ± 0,23
	Acétate d'éthyle	0,12 ± 0,01	2,90 ± 0,01
	Cyclohexane	0,07 ± 0,01	1,69 ± 0,01

Le tableau 20 montre que l'utilisation de solvants à polarité plus élevée favorise l'extraction des composés de l'écorce de *M.tenuiflora*, avec le rendement d'extraction le

plus élevé pour l'extrait de méthanol (31%), suivi de l'extrait aqueux (11%) comme observé dans le tableau 1 de l'article, même si la méthode d'extraction est différente.

L'acétate d'éthyle (2,9%) et le cyclohexane (1,7%) ont montré les rendements d'extraction les plus faibles. Or ces solvants, très peu polaires, sont couramment utilisés pour l'extraction de composés lipophiles. Cela laisse donc penser que la majorité des composés extractibles de l'écorce de *M.tenuiflora* sont des composés de nature plutôt polaire, et peu lipophile.

II.3.3.2 Profil HPLC-MS de l'extrait aqueux

Pour analyser les composés présents dans l'extrait aqueux *M.tenuiflora*, ils ont été analysés par HPLC couplé à une détection MS. Le chromatogramme (Figure 20) montre qu'une dizaine de composés sont détectés en mode positif.

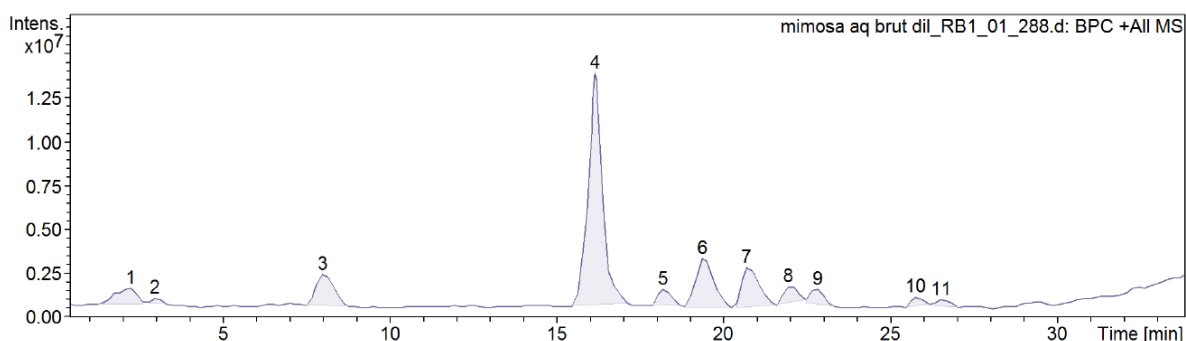


Figure 20. Chromatogramme de l'extrait brut de *M. tenuiflora* obtenu par HPLC-MS sur une colonne Kinetex F5 et avec une détection masse en mode positif.

Le tableau 22 montre les masses détectées dans l'extrait aqueux. La Yuremamine ainsi deux isomères ont pu être identifiés. Les tanins ne sont pas visibles sur ce chromatogramme car la détection de la masse m/z ne permet pas de les analyser. Cependant certains motifs oligomériques comme la catéchine ou épicatechine, peuvent être identifiés en recherchant spécifiquement leur masse caractéristique : monomères $m/z=291$; dimères $m/z=577$, trimères $m/z=865$.

Tableau 22. Masses relevées par HPLC-MS ESI+ dans l'extrait aqueux de *M. tenuiflora*.

Pic n°	Temps de rétention (min)	m/z	Proposition de composé

1	2,2	221,0	
2	2,9	200,1 371,1	
3	8,0	305,0 195,0	
4	16,1	477,2	Yuremamine
5	18,2	249,1 477,2	Isomère de Yuremamine
6	19,4	477,2	Isomère de Yuremamine
7	20,7	461,2	
8	21,9	437,2	
9	22,8	461,2	
10	25,8	437,2	
11	26,5	465,2	

II.3.3.3 Profil HPLC-MS de l'extrait méthanolique

L'extrait méthanolique, dont selon la polarité, la composition est la plus proche de l'extrait aqueux, contient en grande partie des tanins condensés qui peuvent être extraits avec un solvant un peu moins polaire que l'eau, e.g. méthanol et éthanol. Ces composés présents en quantité importante dans l'écorce, se retrouvent idéalement dans cet extrait.

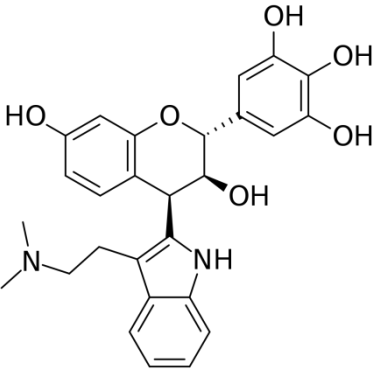
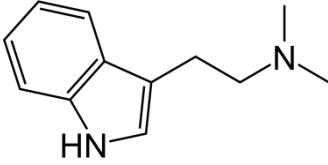
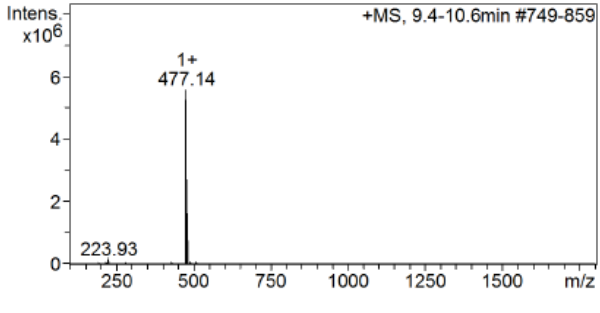
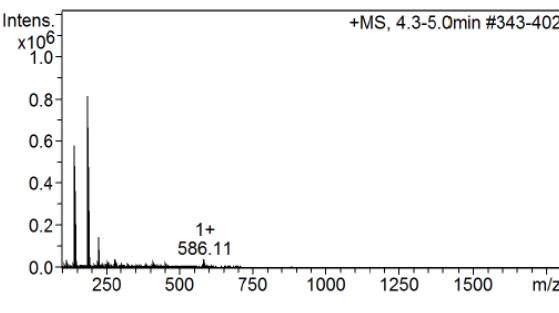
Tableau 23. Composés identifiés par HPLC-MS dans l'extrait méthanolique de *M. tenuiflora*.

Composé	Temps de rétention (min)	m/z	Composé rapporté	m/z	Référence
1	4,26	188,93	N, N-diméthyltryptamine (DMT)	189	(Vepsäläinen et al., 2005)
2	13,26	477,14	Yuremamine	477,1	

En ce qui concerne l'identification des composés, il a été possible d'identifier le composé **2** (Yuremamine) dans l'extrait aqueux, dans la fraction ainsi que dans l'extrait méthanolique par HPLC-MS (Figure 12). Le composé **1** a pu être identifié. Il correspondrait à la N, N-diméthyltryptamine (DMT), bien que celle-ci n'ait pas été trouvée dans l'extrait aqueux. Ces deux composés ainsi que leurs spectres de masse respectifs ont été précédemment rapportés pour des extraits de *M. tenuiflora* (Vepsäläinen et al., 2005), c'est pourquoi il a été possible de les identifier. En effet, les standards pour ces composés ne sont pas disponibles commercialement.

Environ 20 pics avec leurs masses respectives ont été détectés, mais en raison du manque d'informations bibliographiques, il n'a pas été possible de les corrélérer pour les identifier. Le tableau 24 montre les spectres de masse des composés mentionnés et les molécules correspondantes.

Tableau 24. Spectres de masse de la N, N-diméthyléthyltryptamine (DMT) et de la Yuremamine identifiés par HPLC-MS dans l'extrait méthanolique de *M. tenuiflora* (ESI mode positif).

Yurémamine Mw = 476,529 g·mol ⁻¹	N, N-diméthyltryptamine Mw = 188,26 g·mol ⁻¹
	
	

II.3.4 Conclusion

En conclusion, il a pu être démontré que les molécules responsables de l'effet anti-aflatoxinogène et du pouvoir antioxydant de l'extrait aqueux de *M. tenuiflora* sont très probablement des polyphénols. L'inhibition de la production d'AFB1 induite par cet extrait aqueux est transcriptionnelle et passe par la modulation négative de l'expression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'AFB1 et en particulier, les deux gènes régulateurs de ce cluster *aflR* et *aflS*.

L'extrait a également affecté l'expression de certains gènes liés au stress oxydatif, comme le facteur de transcription global *mtfA*, le facteur de transcription bZIP *atfA*, le gène *msnA* impliqué dans la réponse au stress fongique et le gène *catA*, codant pour les enzymes catalases, qui sont directement impliquées dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif.

Après un fractionnement bio-guidé, il a été établi que ce sont spécifiquement les tanins condensés qui sont les principaux responsables de l'effet anti-aflatoxinogène, probablement en lien avec leur capacité antioxydante.

Deux composés (N,N-diméthyltryptamine et Yuremamine) ont été identifiés dans l'extrait aqueux de *M. tenuiflora* par HPLC-MS. Cependant, seule la Yuremamine a été retrouvée dans la fraction active obtenue après fractionnement sur amberlite. Ce composé n'étant pas un tanin condensé d'autres études semblent nécessaires pour confirmer ou réfuter le rôle de ce composé dans l'effet anti-aflatoxinogène.

Par ailleurs, il est intéressant de comparer ces résultats avec ceux obtenus pour les extraits des deux autres plantes utilisées dans ce travail. En effet, les trois extraits aqueux présentent une forte concentration de composés phénoliques, une forte activité antioxydante et un effet anti-aflatoxinogène intéressant. Cependant, les extraits ont été obtenus à partir de différentes espèces végétales mais aussi à partir de différentes parties des plantes : écorce pour *M. tenuiflora* et feuilles pour *L. tridentata* et *L. graveolens*. Il semble donc très intéressant de voir si les composés impliqués dans les activités biologiques sont communs ou, au contraire, différents.

Le chapitre suivant se concentre donc sur le fractionnement et la caractérisation des extraits aqueux de *L. tridentata* et *L. graveolens*, afin de les comparer aux résultats déjà obtenus pour *M. tenuiflora*.

II.4 Etude du fractionnement des extraits aqueux de *Larrea tridentata* et *Lippia graveolens*

II.4.1 Introduction

Les résultats présentés dans le chapitre précédent confirment l'importance des polyphénols, dans le cas de l'écorce de *M. tenuiflora*, sur la capacité antioxydante et sur l'effet anti-aflatoxinogène de l'extrait aqueux. Parallèlement, les extraits aqueux de *L. tridentata* et *L. graveolens* ont également démontré une capacité antioxydante élevée et un effet anti-aflatoxinogène intéressant (chapitre II.2.).

S'il est vrai que les trois extraits aqueux présentent des caractéristiques comparables en termes de teneurs en polyphénols, d'activité antioxydante et d'effet anti-aflatoxinogène, sur la base de la littérature présentée au chapitre II.1. Il est clair que les composés responsables de ces effets pourraient être différents pour chacun des extraits.

Par conséquent, le but de cette étude était, dans un premier temps, de fractionner les extraits aqueux de *L. tridentata* et *L. graveolens* afin d'identifier pour chacun la fraction responsable des activités biologiques. Dans un second temps, il s'agissait de caractériser la fraction active et d'identifier les familles moléculaires responsables de cette activité. La comparaison de ces fractions actives pourrait permettre de savoir si l'effet anti-aflatoxinogène est toujours lié à la présence de polyphénols et sa corrélation avec la capacité antioxydante de l'extrait, et d'autre part, si la molécule, ou du moins la famille de molécules responsables de l'effet anti-aflatoxinogène, est la même quel que soit l'extrait.

A l'heure actuelle, aucune preuve scientifique ne permet d'avancer (ou de réfuter) qu'une seule molécule ou famille de molécules est responsable de l'effet aflatoxinogène. Pour cette raison, il est nécessaire d'identifier la part réelle d'implication des polyphénols dans cette activité en appliquant par exemple un fractionnement bioguidé.

II.4.2 Fractionnement sur colonne

La méthode de fractionnement utilisée pour ces essais a été la même que celle utilisée pour fractionner l'extrait de *M. tenuiflora*, basée sur la chromatographie d'adsorption sur colonne, en utilisant la même résine macroporeuse, de type Amberlite FPX66. Cette méthode est décrite en détail dans la section « Matériel et Méthodes ».

Pour chacun des extraits fractionnés, deux fractions ont été obtenues en raison de leur affinité pour la résine Amberlite: une première fraction riche en sucres et en protéines et une seconde fraction riche en polyphénols.

II.4.2.1 Fractionnement de *Larrea tridentata*

La Figure 21, présente le fractionnement de l'extrait aqueux de *L. tridentata* en une fraction aqueuse et une fraction éthanolique. Ces fractions ont été analysées pour leur teneur en polyphénols et leur activité antioxydante. Le rendement de cette séparation de *L. tridentata* est de 94% en matière sèche et de 84% en polyphénols totaux.

Les résultats de la caractérisation de l'extrait aqueux de *L. tridentata*, discutés dans la section II.2, ont montré que cet extrait a le rendement d'extraction le plus élevé (25%), donc la plus grande quantité de matière sèche dans l'extrait, mais le plus faible rendement en polyphénols par rapport aux autres extraits aqueux étudiés (tableau 25). Cependant, il peut toujours être considéré comme un extrait riche en polyphénols. C'est pourquoi il est intéressant de comprendre la répartition des molécules ainsi que leur bioactivité après fractionnement.

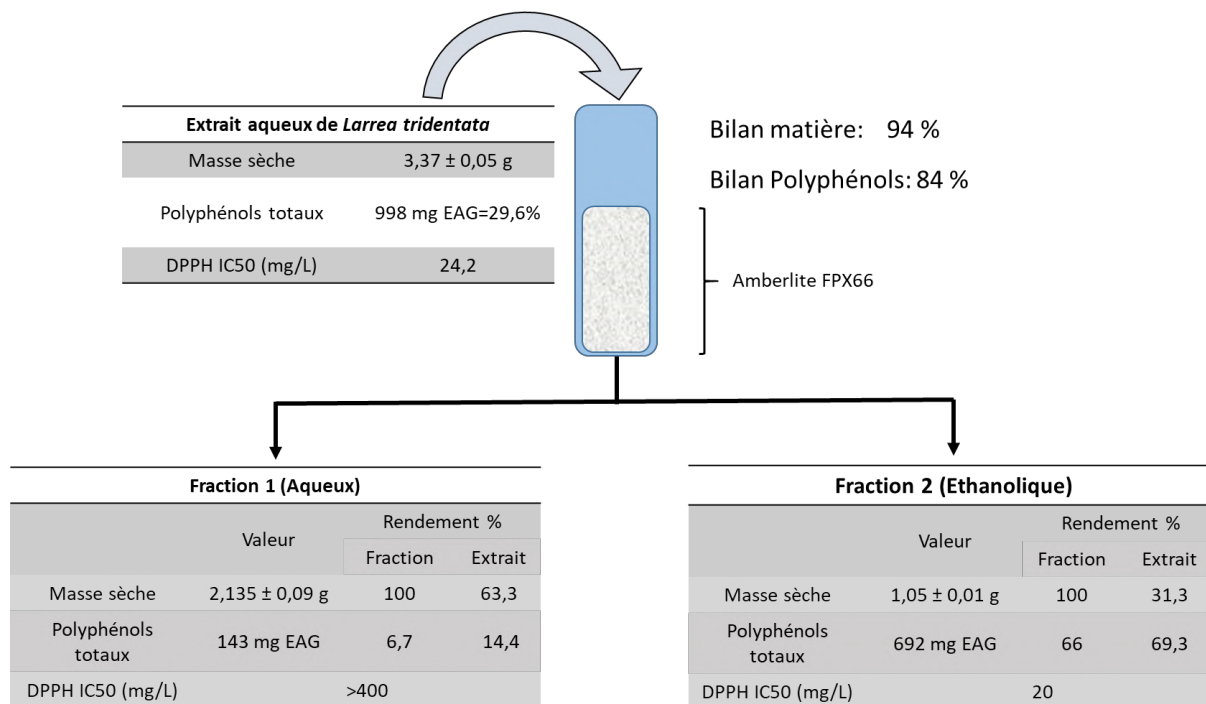


Figure 21. Schéma du fractionnement de l'extrait aqueux de *Larrea tridentata* sur résine Amberlite FPX66.

Le fractionnement, de 3,37 g de l'extrait aqueux de *L. tridentata* (en équivalent sec) a été réalisé. Cet extrait contient une teneur totale en polyphénols de 998 mg EAG, ce qui correspond à 29.6 % de la masse sèche de l'extrait. Après fractionnement, le rendement total en matière sèche est de 94% ; la fraction 1 étant la plus concentrée en matière sèche avec 63%, soit deux fois plus que la fraction 2 (31%). En ce qui concerne le bilan matière des polyphénols, 84% ont été retrouvés après fractionnement, montrant que seule une faible partie de ces composés (16%) est resté adsorbé sur la résine après la procédure de désorption. Comme prévu, la fraction 2 contient une grande quantité de polyphénols : 692 mg EAG, ce qui correspond à 69% du total des polyphénols présents dans l'extrait aqueux initial. Ce premier fractionnement en Amberlite FPX66 visait précisément à séparer les polyphénols contenus dans l'extrait en les adsorbant sur la résine grâce à leurs liaisons hydrophobes puis en les désorbant avec de l'éthanol. La fraction I, qui a été obtenue par élution de la colonne avec de l'eau, est principalement composée de sucres et de protéines. Pour cette raison, sa teneur en polyphénols est faible, de l'ordre de 143 mg EAG, ce qui représente seulement 6,7% de la masse sèche de la fraction et 14,4% des polyphénols de l'extrait brut. En ce qui concerne l'activité antioxydante, elle a chuté dans la fraction 1 et légèrement augmenté dans la fraction 2 par rapport à l'extrait de départ, ce qui montre que le fractionnement contribue à concentrer les composés antioxydants dans cette fraction.

Ces résultats de fractionnement montrent que l'extrait aqueux de *L. tridentata* a une teneur plus élevée en composés très hydrophiles de type sucres et protéines (63%) qu'en composés phénoliques (31%). La figure 22 montre une image de l'aspect visuel des fractions obtenues.



Figure 22. Aspects de la fraction 1 et de la fraction 2 de *Larrea tridentata*.

Les résultats obtenus concernant l'activité antifongique et anti-aflatoxinogène des fractions de l'extrait aqueux de *L. tridentata* sont présentés dans la Figure 23.

La figure 23-a montre les résultats obtenus après mise en contact de la fraction 1 de l'extrait aqueux de *L. tridentata* avec *A. flavus*. La croissance du champignon n'est pas affectée, avec une inhibition maximale de 5% à une concentration de 0,2 mg DM/mL. Cependant, à des concentrations plus élevées, l'effet inhibiteur sur la croissance diminue. Par conséquent, l'effet de l'extrait sur le développement du champignon n'est pas lié à sa concentration dans le milieu.

En ce qui concerne l'inhibition de la production d'AFB1, on peut observer que la fraction 1, n'a qu'un effet limité sur la production de la toxine, avec une inhibition maximale de seulement 18% à une concentration de 0,2 mg DM/mL (pour rappel, une inhibition de 58% avait été obtenue à cette concentration avec l'extrait aqueux). Par ailleurs, il faut noter que, la encore, l'effet sur la production d'AFB1 à 0,3 et 0,4 mg DM/mL est plus faible et la production totale de toxine atteint même des niveaux plus élevés que ceux observés pour le contrôle. Cet effet pourrait être lié à la présence d'une majorité de sucres dans cette fraction. Ces molécules pourraient représenter une base nutritive et être utilisées par *A. flavus* pour se développer et produire plus d'aflatoxines.

En revanche, pour la fraction 2 (Figure 23-b), une inhibition dose-dépendante de la croissance fongique est observée, avec la plus forte inhibition observée (19%) à la plus

forte concentration testée (0,4 mg DM/mL), soit presque le double de celle obtenue pour l'extrait aqueux à la même concentration.

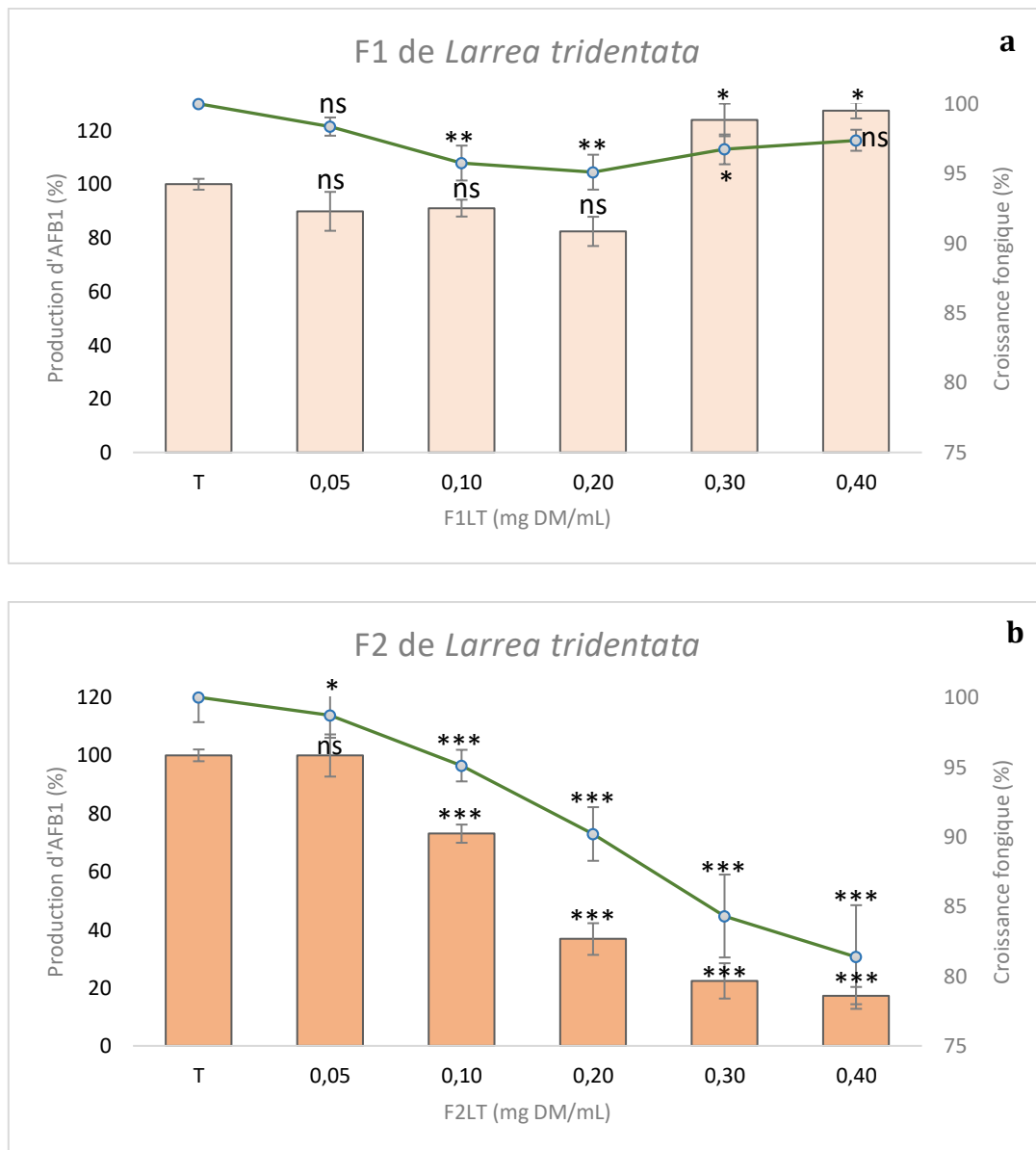


Figure 23. Production d'AFB1 et croissance fongique des fractions obtenues après fractionnement de l'extrait aqueux de *Larrea tridentata* sur *A. flavus*, a) fraction 1, b) fraction 2. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à une culture contrôle sans extrait. Les concentrations en extrait sont exprimées en mg d'extrait sec/mL de milieu).

Dans la fraction 2, l'inhibition de la production d'AFB1 est dose-dépendante et beaucoup plus importante que dans la fraction 1, avec une inhibition maximale de 83 % à la plus forte concentration testée (0,4 mg MS/mL). L'inhibition observée après exposition à cette

fraction est même plus élevée que celle observée pour l'extrait aqueux de départ (inhibition maximale de la production de toxine de 58 %).

L'efficacité de la fraction 2 sur l'inhibition de l'AFB1 peut s'expliquer par sa teneur plus élevée en polyphénols, qui est bien supérieure à celle de la fraction 1 mais également supérieure à celle de l'extrait aqueux initial. Par ailleurs, la perte de l'activité antioxydante de la fraction 1 et son augmentation dans la fraction 2 (Figure 23) confirment que les polyphénols impliqués dans cette activité se trouvent uniquement dans la fraction 2. Par ailleurs, les deux activités biologiques analysées (activité antioxydante et activité anti-aflatoxinogène) pourraient être liées, comme nous l'avons décrit pour l'extrait aqueux de *M. tenuiflora* (voir section II.3) et comme cela a aussi été rapporté dans d'autres publications (Bok & Keller, 2004; J. H. Kim et al., 2006; Loi et al., 2020; Mahoney & Molyneux, 2004).

II.4.2.2 Fractionnement de *Lippia graveolens*

Un schéma illustrant les résultats obtenus pour chaque fraction obtenue à partir de l'extrait aqueux de *L. graveolens* est présenté sur la figure 24.

Comme pour l'extrait aqueux de *L. tridentata*, la caractérisation de l'extrait aqueux de *L. graveolens* a été présentée au point II.2.

Cet extrait présente la plus faible quantité de polyphénols par gramme de matière sèche d'extrait et la plus faible activité antioxydante des trois plantes utilisées. En contrepartie, le rendement d'extraction des polyphénols par rapport à la matière initiale est légèrement supérieur à celui obtenu pour *L. tridentata*, pour lequel la matière végétale initiale était aussi les feuilles. Par contre, ce rendement est très inférieur à celui obtenu pour l'écorce de *M. tenuiflora*. Du point de vue de ses activités biologiques, l'inhibition de l'AFB1 est particulier et intéressant. Ceci suggère que la nature des molécules présentes dans cet extrait aqueux pourrait être différente de celles trouvées pour les deux plantes précédemment étudiées.

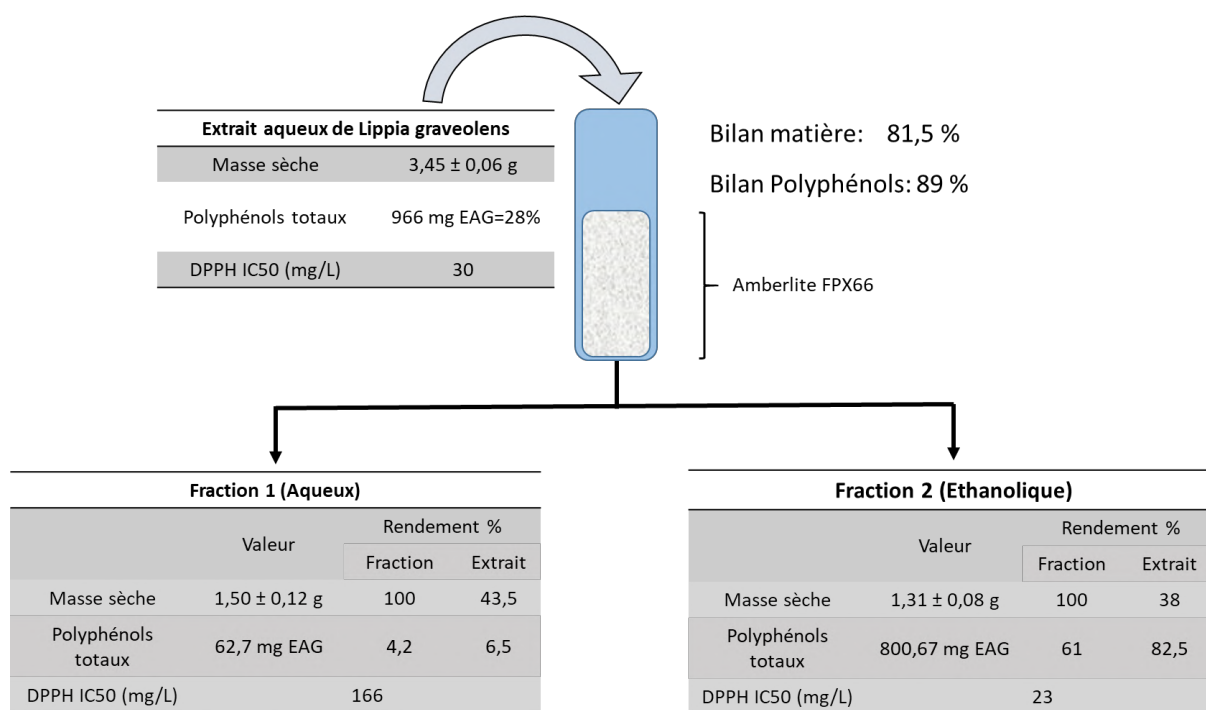


Figure 24. Schéma du fractionnement de l'extrait aqueux de de *Lippia graveolens* sur résine Amberlite FPX66.

Pour le fractionnement de l'extrait aqueux de *L. graveolens*, l'équivalent de 3,45 g de matière sèche a été utilisé, ce qui correspond à une teneur totale en polyphénols de 966 mg EAG. Après fractionnement, deux fractions ont été obtenues, qui représentent, au total, un taux de récupération de la matière sèche de 82%. C'est inférieur au taux de récupération de la matière sèche obtenue lors du fractionnement de l'extrait de *L. tridentata*. Par contre, le bilan polyphénolique est plus élevé que celui de *L. tridentata* avec 89%. Cela peut être dû aux différents types de composés présents dans l'extrait de *L. graveolens* qui présentent une désorption plus efficace que pour l'extrait de *L. tridentata*.

La fraction 1 présente un rendement de 44% par rapport à la masse sèche présente dans l'extrait aqueux initial et ce rendement est supérieur à celui obtenu pour la fraction 2 (38%). Cependant, en comparant ces valeurs à celles obtenues pour le fractionnement des extraits aqueux de *M. tenuiflora* et *L. tridentata*, la fraction 2 obtenue à partir de l'extrait aqueux de *L. graveolens* présente la teneur en polyphénols la plus élevée avec 801 mg EAG. En termes de bilan matière de ce fractionnement, les polyphénols sont récupérés à 89%, la fraction 1 ne contenant que 7% des polyphénols de l'extrait aqueux initial. En parallèle de la concentration en polyphénols, la capacité antioxydante de la fraction 2 (IC₅₀=23

mg/L) est supérieure par rapport à celle de l'extrait aqueux ($IC_{50}=30$ mg/L) alors qu'elle a considérablement diminué dans la fraction 1 ($IC_{50}=166$ mg/L).

On peut considérer que l'objectif de ce fractionnement a été atteint, car la plupart des composés phénoliques ont été conservés dans la fraction 2 et, en même temps, la capacité antioxydante de cette fraction a augmenté. A l'inverse, les composés phénoliques ne se trouvent qu'à l'état de traces dans la fraction 1, ce qui explique que la capacité antioxydante de cette fraction a été fortement réduite par rapport à celle de l'extrait aqueux de départ. La figure 25 montre l'aspect visuel des fractions obtenues après fractionnement de l'extrait aqueux.



Figure 25. Aspects de la fraction 1 et de la fraction 2 de *Lippia graveolens*.

Enfin, les résultats obtenus concernant l'activité antifongique et anti-aflatoxinogène des fractions obtenues après fractionnement de l'extrait aqueux de *L. graveolens* sont présentés dans la Figure 26.

Les résultats obtenus avec la fraction 1 sur la croissance et la production d'AFB1 chez *A. flavus* sont présentés dans la figure 26-a. Une réduction de 3% de la croissance fongique est observée par rapport au contrôle, et ce dès la première concentration testée (0,025 mg DM/mL). Cette légère inhibition reste ensuite constante, même en augmentant la concentration de l'extrait jusqu'à 0.2 mg DM/mL. Ainsi, avec cette fraction, le développement du champignon ne semble pas dépendant de la concentration de la fraction présente dans le milieu. En ce qui concerne la production d'AFB1, il n'y a aucune

inhibition par rapport au contrôle à des concentrations comprises entre 0,025 et 0,15 mg DM/mL. On note une légère inhibition de 19% à une concentration de 0,2 mg DM/mL. On peut donc considérer que la fraction 1 a perdu la capacité d'inhiber l'AFB1 chez *A. flavus* observée avec dans l'extrait aqueux initial.

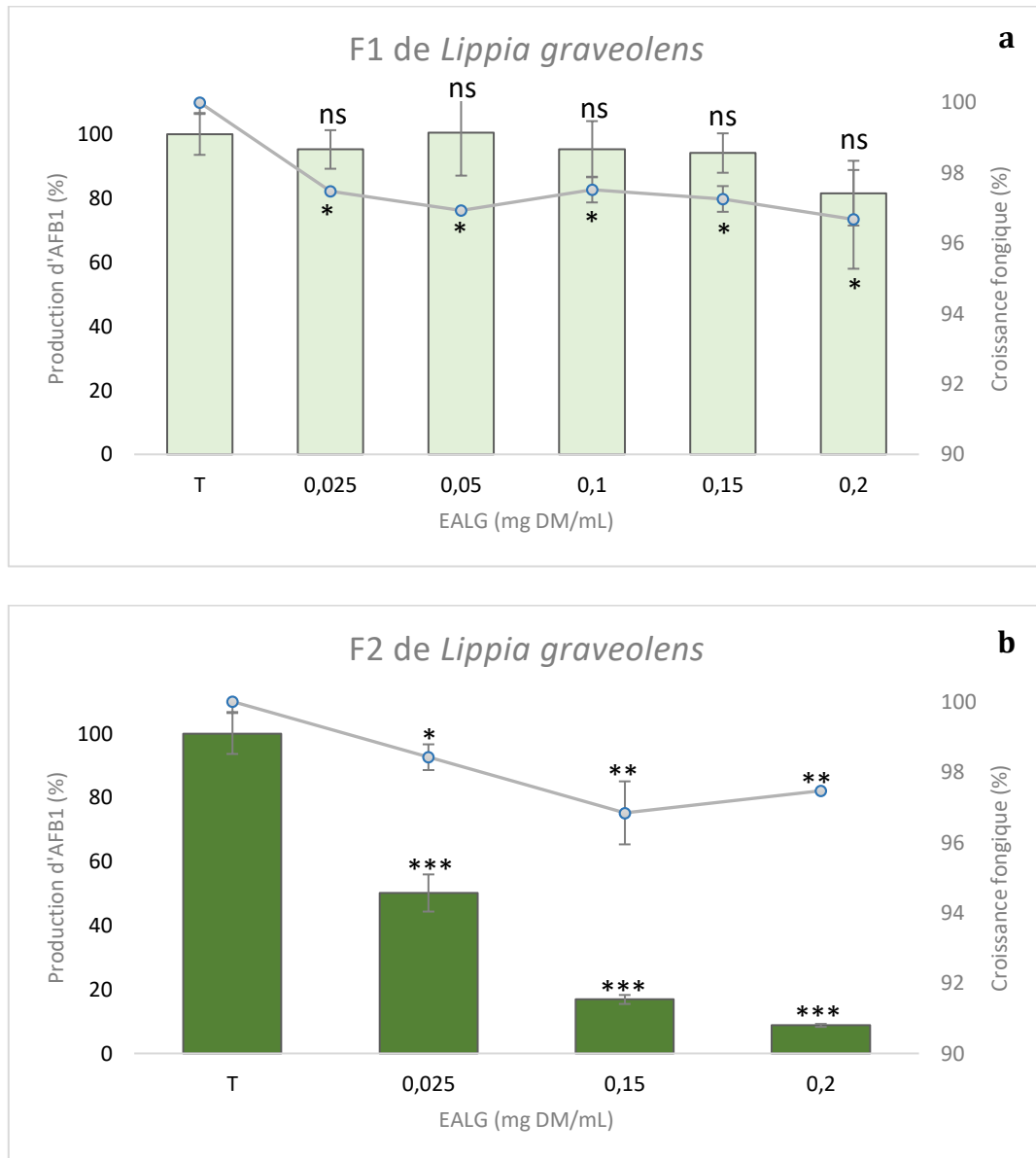


Figure 26. Production d'AFB1 et croissance fongique après exposition d'*A. flavus* à des concentrations croissantes des deux fractions obtenues après fractionnement de l'extrait aqueux de *Lippia graveolens* a) fraction 1, b) fraction 2. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à une culture contrôle sans fraction. Les concentrations sont exprimées en mg d'extrait sec/mL).

Pour la fraction 2 (figure 26-b), l'inhibition de la croissance fongique est similaire à celle observée pour la fraction 1. L'inhibition la plus importante (3%) est observée après

culture en présence de 0,15 mg DM/mL. Cette inhibition devient plus faible à une concentration plus élevée et ne semble donc pas dose-dépendante.

En revanche, l'inhibition de la production d'AFB1 est beaucoup plus importante pour la fraction 2 que pour la fraction 1, avec une inhibition maximale de 91% observée à la plus forte concentration testée (0,2 mg DM/mL). Pour cette fraction 2 l'inhibition est dose-dépendante. Cependant, le plus intéressant est que, même à de très faibles concentrations (0,025 mg DM/mL), l'inhibition de la production d'AFB1 est supérieure à 50 %, ce qui est beaucoup plus important que celle entraînée par l'extrait aqueux initial.

Par conséquent, pour les deux extraits aqueux fractionnés au cours de ces essais, *L. tridentata* et *L. graveolens*, la plus forte inhibition de l'AFB1 est observée après exposition à la fraction 2, qui se caractérise par la plus forte teneur en polyphénols et une forte capacité antioxydante. Il serait maintenant intéressant de confirmer que les polyphénols et l'activité antioxydante de ces extraits sont bien responsables de leur capacité à inhiber la production d'AFB1 chez *A. flavus*.

II.4.3 Comparaison des trois extraits aqueux et de leurs fractions respectives

Nous allons maintenant essayer de comparer les trois extraits aqueux, ainsi que leurs fractions, du point de vue du rendement d'extraction, du contenu en composés phénoliques et de leurs activités biologiques. En effet, cela pourrait permettre d'identifier une corrélation entre la composition des extraits/fractions et l'inhibition de la production d'AFB1 chez *A. flavus*.

Le tableau 25 récapitule les résultats de rendement pour chaque étape de fractionnement ainsi que la teneur en polyphénols totaux présents dans chaque extrait/fraction. En ce qui concerne les activités biologiques, les IC₅₀ de l'activité antiradicalaire et de l'activité anti-aflatoxinogène ont été déterminées pour chaque extrait/fraction et sont également indiquées dans le tableau 25.

Tableau 25. Rendement de l'étape de fractionnement, teneur en polyphénols totaux, activité antiradicalaire et activité anti-aflatoxinogène des extraits aqueux et des fractions de *Mimosa tenuiflora*, *Larrea tridentata* et *Lippia graveolens*.

Matière première	Rendement de l'étape (%)	Teneur en polyphénols dans l'extrait sec (mgEAG/g de matière sèche dans l'extrait)	Activité antiradicalaire IC ₅₀ (mg/L)	Activité antiaflatoxigène IC ₅₀ (mg DM/mL)
<i>Mimosa tenuiflora</i>	11	397 ± 22	10	0,15
F1	11	59 ± 9	18	0,10
F2	74	999 ± 38	9	0,025
<i>Larrea tridentata</i>	25	296 ± 12	24	0,34
F1	63	143 ± 15	>400	nd
F2	31	658 ± 18	20	0,13
<i>Lippia graveolens</i>	23	280 ± 30	30	0,12
F1	44	41 ± 8	166	nd
F2	38	611 ± 16	23	0,025

Au cours du fractionnement de l'extrait aqueux de *M. tenuiflora*, un rendement plus élevé a été obtenu pour F2 (74%) que pour F1 (11%), contrairement à ce qui a été observé pour lors du fractionnement de *L. tridentata* et *L. graveolens*, pour lesquels un rendement plus élevé a été obtenu pour la fraction 1 (63% et 44% respectivement) que pour la fraction 2, (31% et 38% respectivement). Ces résultats sont liés à la composition des extraits aqueux utilisés. Les extraits aqueux de *L. tridentata* et *L. graveolens* ont été obtenus à partir des feuilles des plantes. Il est donc logique qu'ils contiennent une proportion plus élevée de

sucre et de protéines solubles que l'extrait aqueux de *M. tenuiflora*, obtenu, lui, à partir de l'écorce de la plante. Les feuilles contiennent des composés plus facilement extractibles que l'écorce qui assure une couche de protection vis-à-vis des attaques exogènes. Les composés de type phénoliques produits par la plante dans les feuilles et dans l'écorce sont par conséquent de nature différente même s'ils sont issus du même métabolisme de l'acide shikimique.

La deuxième fraction obtenue à partir de chaque extrait aqueux présente systématiquement un contenu le plus élevé en composés phénoliques. *L. tridentata* est l'extrait qui présente le taux de séparation le plus bas avec seulement 4 fois plus de composés phénoliques dans F2 que dans F1. Pour les extraits aqueux de *L. graveolens* et *M. tenuiflora*, ce taux de séparation est de 14 et 16 fois respectivement. Ceci pourrait s'expliquer par la nature différente des composés phénoliques présents dans les extraits aqueux, qui peuvent être plus ou moins retenus par la résine Amberlite en raison de l'affinité de leurs interactions.

Concernant l'activité anti-aflatoxinogène, à première vue, elle semble directement liée à la teneur en composés phénoliques de l'extrait. En effet, pour chaque extrait aqueux, et après fractionnement, la fraction ayant la teneur la plus élevée en composés phénoliques est celle qui a également la plus grande capacité à inhiber l'AFB1. Il s'agit de la fraction 2.

Cependant, dans la fraction 1 obtenue après fractionnement de l'extrait aqueux de *L. tridentata*, il subsiste une teneur relativement élevée en composés phénoliques (143 mg EAG/g de matière sèche dans l'extrait) par rapport à la quantité résiduelle mesurée dans les fraction 1 des extraits aqueux de *M. tenuiflora* et *L. graveolens* (59 et 41 mg EAG/g de matière sèche respectivement). Cependant, cela n'a pas d'influence sur l'activité anti-aflatoxinogène puisque la fraction 1 de *L. tridentata* n'inhibe pas la production d'AFB1 aussi efficacement que la fraction 1 de *L. graveolens*. Par conséquent, les composés de nature phénolique de ces deux fractions sont probablement différents dans leurs structures et leurs activités biologiques.

Pour *Mimosa tenuiflora*, la fraction 1 a une activité anti-AFB1 plus importante que l'extrait aqueux lui-même ; la fraction 2 ayant une activité encore plus élevée. En effet, pour *M. tenuiflora*, l'activité anti-AFB1 n'est pas strictement séparée entre les deux fractions puisque la fraction 1 inhibe plus la production d'AFB1 que l'extrait aqueux. Il est donc

probable que les polyphénols présents dans les fractions 1 obtenues pour chacune des plantes soient très différents en termes de structure mais aussi d'activité, impliquant des coefficients de réponse variables lors du dosage effectué avec le réactif de Folin qui permet de les caractériser de manière globale.

Il est intéressant d'analyser l'effet des extraits sur la synthèse d'AFB1 en lien avec leur activité anti-radicalaire. En effet, il se dégage une corrélation « très intéressante » entre la capacité antioxydante d'un extrait et sa capacité à inhiber la production d'AFB1 chez *A. flavus*. Cette corrélation est illustrée sur la figure 27. Elle pourrait expliquer pourquoi la fraction 1 de *M. tenuiflora* présente une activité anti-aflatoxinogène, car elle présente en effet une activité antioxydante assez importante ($IC_{50} = 18 \text{ mg DM/L}$). A l'inverse, la fraction 1 de *L. tridentata* ne présente pas d'activité antioxydante, et n'a pas la capacité d'inhiber la production d'AFB1. De manière similaire, la fraction 1 de *L. graveolens* a une activité antioxydante plutôt faible et une activité anti-AB1 limitée.

Dans la littérature, il existe quelques études qui soutiennent cette corrélation, concluant que certains composés phénoliques qui possèdent des activités antioxydantes élevées inhibent la production d'aflatoxines. Par exemple, les tanins hydrolysables inhibent significativement la biosynthèse des aflatoxines (Mahoney & Molyneux, 2004). L'acide ascorbique diminue les ROS et, en parallèle, est capable d'inhiber significativement la production d'aflatoxines, sans affecter la croissance du champignon (J. H. Kim et al., 2006). De même, l'acide caféique est une autre molécule antioxydante qui a montré un effet inhibiteur sur l'aflatoxinogénèse (Bok & Keller, 2004).

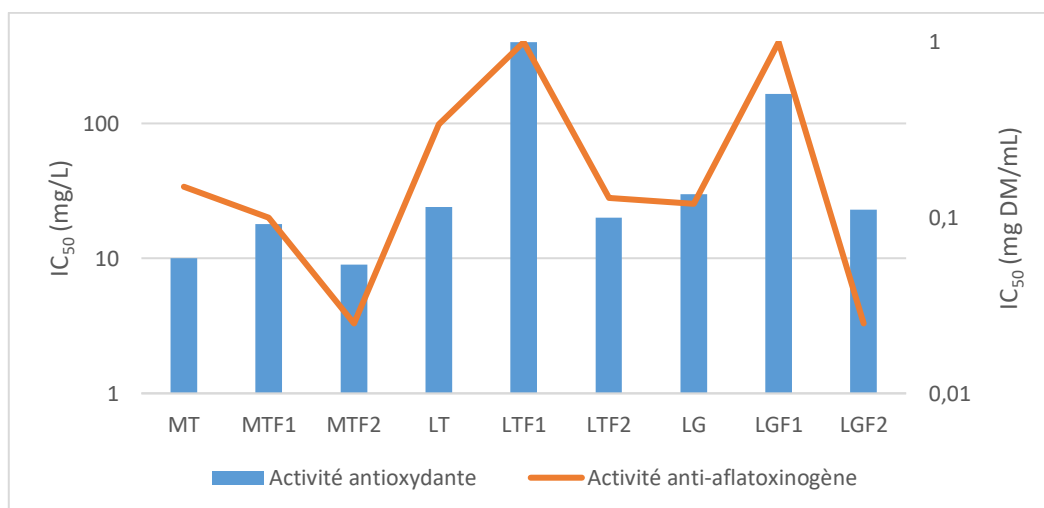


Figure 27. Relation entre l'activité antioxydante et activité anti-aflatoxinogène des extraits et fractions testés.

II.4.4 Conclusion

La première conclusion que l'on peut tirer des résultats présentés dans cette partie est que, quelle que soit la composition de l'extrait aqueux étudié, le fractionnement par chromatographie d'adsorption en utilisant l'amberlite FPX66 est efficace pour séparer les composés phénoliques des sucres et des protéines présentes dans les extraits. Elle l'est aussi pour isoler l'activité antioxydante.

Les trois extraits aqueux fractionnés ont des compositions différentes. Le contenu en composés phénoliques était différent dans chaque extrait. Chez *M. tenuiflora*, il a été montré que les principaux composés phénoliques étaient des tanins condensés, ce qui est logique puisque l'extrait était issu de l'écorce. Chez *L. tridentata* et *L. graveolens*, il était attendu d'obtenir des composés phénoliques de nature proche. Cependant, après fractionnement, des différences de composition ont été observées. Ceci est lié au fait que les composés phénoliques de l'extrait aqueux de *L. tridentata* n'ont pas autant d'affinité structurale pour l'Amberlite que ceux présents dans les deux autres extraits aqueux.

La fraction 2 obtenue après fractionnement des deux extraits aqueux de *M. tenuiflora* et *L. graveolens* a présenté la plus grande capacité à inhiber la production d'AFB1.

Enfin, la conclusion la plus intéressante est la démonstration que la capacité des extraits aqueux et de leurs fractions à inhiber la production d'AFB1 chez *A. flavus* est fortement liée à leur activité antioxydante.

II.5 Etude de l'effet de différents matériaux enrobant sur la microencapsulation par Spray Drying de l'extrait aqueux de l'écorce de *Mimosa tenuiflora*

II.5.1 Introduction

Dans le chapitre II.2, les résultats correspondant à l'extraction et à la caractérisation des extraits aqueux des trois plantes utilisées dans ce travail ont été présentés, mettant en évidence leur capacité à inhiber la production d'AFB1 sans inhiber la croissance d'*A. flavus*. L'extrait aqueux de *M. tenuiflora* s'est avéré avoir la plus forte teneur en composés phénoliques (397 mg EAG/g MS) et l'activité antioxydante la plus élevée ($IC_{50} = 10\text{mg/L}$) des trois extraits de plantes étudiés. Pour cette raison, cet extrait a été fractionné et l'étude de sa composition fine a révélé le rôle des composés phénoliques, en particulier des tanins condensés et leur relation avec l'activité antioxydante et l'effet inhibiteur sur la production AFB1. Ces résultats sont présentés dans le chapitre II .3.

Une fois identifié le rôle majeur des composés phénoliques et de leur activité antioxydante inhérente dans l'effet anti-aflatoxinogène de l'extrait aqueux de *M. tenuiflora*, il nous a semblé essentiel de rechercher des stratégies de valorisation de cet extrait comme moyen de lutte contre les aflatoxines, à la fois au champ et au stade du stockage des grains, sans pour autant modifier la flore microbienne naturelle.

Le principal verrou pour atteindre cet objectif est le fait que l'activité des polyphénols et en particulier des antioxydants peut évoluer dans le temps et être réduite en raison des conditions environnementales lors du stockage (lumière, température, pH, oxygène) (Zhang et al., 2020).

Par conséquent, l'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de la microencapsulation (technique proposée comme étape de formulation dans le but de stabiliser et protéger les composés antioxydants pendant le stockage et l'application d'antioxydants (Tomson et al. 2020)) en utilisant différents matériaux supports de manière à préserver les propriétés de l'extrait. Ainsi au cours de la mise en œuvre de cette technique, nous avons suivi les capacités antioxydante et anti-aflatoxine des microparticules formulées avec l'extrait aqueux de *M. tenuiflora*.

Grâce au séchage par atomisation, les ingrédients actifs sont piégés dans les parois de l'enrobant pour former des microparticules, limitant leur réactivité avec les facteurs environnementaux (Zhang et al. 2020 ; Dumitrascu et al. 2021). Différents types de biopolymères peuvent être utilisés comme matériaux enrobants, tels que les maltodextrines (MD), l'amidon, la gomme arabique et les protéines (Pereira Souza et al. 2017).

Ce procédé peut également permettre l'élaboration d'une formulation sèche d'un extrait actif. En effet, l'application d'un extrait liquide aqueux est inenvisageable dans les conditions de stockage des grains. De ce fait, pour limiter la contamination par les mycotoxines à cette étape, une formulation sèche serait plus compatible avec son utilisation sur grains secs, libérant les composés actifs uniquement en cas de réhumidification du milieu et d'augmentation consécutive du risque de production de mycotoxines.

Dans ce chapitre sont donc présentés, sous forme de publication, les résultats de l'étude de l'encapsulation de l'extrait aqueux d'écorce de *M. tenuiflora* par atomisation, à partir de trois matériaux enrobants différents : maltodextrine, amidon et protéines de soja.

Les conditions de mise en œuvre du procédé d'atomisation de l'extrait de *M. tenuiflora* ont été investiguées et la faisabilité technique a été démontrée avec les trois matériaux enrobants. L'impact du processus d'encapsulation sur les propriétés antioxydantes, antifongiques et anti-aflatoxigènes de l'extrait de *M. tenuiflora* a ainsi été évalué.




Enfin, pour valider la stabilisation au cours de temps de ces effets biologiques par la microencapsulation, ces propriétés ont également été évaluées après un an de stockage à température ambiante et comparées avec celles d'un extrait stocké pendant la même période à -20°C.

Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal international *Molecules* sous le titre "Preservation of *Mimosa tenuiflora* Antiaflatoxigenic Activity Using Microencapsulation by Spray Drying".

**II.5.2 Preservation of *Mimosa tenuiflora* Antiaflatoxigenic Activity
Using Microencapsulation by Spray Drying (*Molecules*, 2022
27(2), 496).**

Article

Preservation of *Mimosa tenuiflora* Antiaflatoxic Activity Using Microencapsulation by Spray-Drying

Christopher Hernandez^{1,2} , Laura Cadenillas^{1,2}, Céline Mathieu³, Jean-Denis Bailly^{2,4,*} 
and Vanessa Durrieu² 

¹ Toxalim (Research Center in Food Toxicology), Université de Toulouse, INRAE, ENVT, EI-Purpan, 31300 Toulouse, France; hernandezhernandezchristopher@gmail.com (C.H.); laura.cadenillas.s@gmail.com (L.C.)

² Laboratoire de Chimie Agro-Industrielle (LCA), Université de Toulouse, INRA, INPT, 4 allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France; vanessa.durrieu@ensiacet.fr

³ Centre d'Application et de Traitement des Agro-Ressources (CATAR), INPT, 4 allée Emile Monso, 31030 Toulouse, France; celine_mathieu@hotmail.com

⁴ Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, 23 Chemin des Capelles, CEDEX, 31076 Toulouse, France

* Correspondence: jean-denis.bailly@envt.fr

Abstract: *Mimosa tenuiflora* aqueous extract (MAE) is rich in phenolic compounds. Among them, condensed tannins have been demonstrated to exhibit a strong antioxidant and antiaflatoxin B1 activities in *Aspergillus flavus*. Since antioxidant capacity can change with time due to environmental interactions, this study aimed to evaluate the ability of encapsulation by spray-drying of *Mimosa tenuiflora* aqueous extract to preserve their biological activities through storage. A dry formulation may also facilitate transportation and uses. For that, three different wall materials were used and compared for their efficiency. Total phenolic content, antioxidant activity, antifungal and antiaflatoxin activities were measured after the production of the microparticles and after one year of storage at room temperature. These results confirmed that encapsulation by spray-drying using polysaccharide wall materials is able to preserve antiaflatoxin activity of *Mimosa tenuiflora* extract better than freezing.

Keywords: encapsulation; spray-drying; antiaflatoxin activity; antioxidant activity; polysaccharides



Citation: Hernandez, C.; Cadenillas, L.; Mathieu, C.; Bailly, J.-D.; Durrieu, V. Preservation of *Mimosa tenuiflora* Antiaflatoxic Activity Using Microencapsulation by Spray-Drying. *Molecules* **2022**, *27*, 496. <https://doi.org/10.3390/molecules27020496>

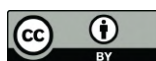
Academic Editor: Benito Soto-Blanco

Received: 13 December 2021

Accepted: 12 January 2022

Published: 13 January 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Aflatoxin B1 (AFB1) is a worldwide public health issue due to its carcinogenic, immunotoxic and mutagenic properties in humans and animals [1,2]. This toxic fungal metabolite is produced by several species of *Aspergillus*, mostly grouped in the *Flavi* section [3]. Aflatoxins are thermophilic species and AFB1 is a major contaminant in regions with hot climate. It is estimated that almost 4.5 billion people are exposed regularly to this contaminant through their diet, leading to an important number of DALYs (death and disability adjusted life years) [4]. Moreover, global warming is increasing the geographic repartition of AFB1 that was recorded in regions usually considered as free, such as Europe [5]. Aflatoxic species can grow and produce toxins either in the field or later during storage, and many crops can be contaminated [6,7]. Due to the toxicity and especially to the carcinogenic property of AFB1, many countries have set up regulation in different foods to limit consumers' exposure [8].

Many works are devoted to identifying strategies to limit AFB1 contamination, detoxifying the toxin when present or limiting its deleterious effects after ingestion [7].

Due to the great stability of the molecule, the best way to protect consumers from its toxicity seems to be avoiding its presence. Among developing strategies aiming to reduce AFB1 contamination of crops, the use of atoxic strains to compete with toxigenic ones was deeply studied [9]. However, this strategy, that leads to interesting results in the short term, could be questionable in the long term due to the risk of recombination between atoxic and toxigenic strains [10]. It also raises the question of its impact on biodiversity.

The use of plant extracts to limit aflatoxigenic species development or AFB1 production is another strategy, and has been increasingly studied over the past 5 years. Several plant extracts, essential oils or isolated components were found able to block aflatoxin B1 production [11,12], among them *Mimosa tenuiflora* aqueous extract (MAE). Contrary to what is observed using essential oils that inhibit AFB1 synthesis together with reducing fungal growth [13], MAE was shown to inhibit AFB1 in *A. flavus* with no impact on fungal development [14]. This result is interesting because if the extract is able to block AFB1 production without modifying fungal growth, its impact on biodiversity shall be limited. It also reduces the risk of resistance development in target species, since it does not create a selective pressure [15]. The effect of MAE was linked to the presence of condensed tannins, in agreement with results observed on mycotoxin production using some wood/forest and vine by-products [16].

In many cases, a positive correlation could be demonstrated between antioxidative ability of plant extracts/compounds and their impact on AFB1 synthesis [11,14,17,18]. This observation raises the question of the preservation of their efficacy with time. Indeed, antioxidative potential can change with time and be reduced due to environmental conditions during storage. Different important factors have been identified, among which are light, temperature, pH, and oxygen [19,20].

Therefore, the aim of this study was to evaluate the impact of microencapsulation using different wall materials on the antioxidative and antiaflatoxigenic ability of MAE.

Indeed, microencapsulation was recently proposed as a final processing step that can be used to stabilize and protect antioxidant compounds during storage and application [21,22]. Through encapsulation, the active ingredients are trapped within the wall materials, limiting their interaction with environmental factors [21,23].

This process can also allow for the development of a dry formulation of an active extract. Regarding the limitation of mycotoxin contamination during storage, such dry formulation would be more compatible with its use on dried grains, the active compounds only being released in case of moistening of the medium and subsequent increased risk of mycotoxin production.

Encapsulation depends on several factors, mainly the type of core and wall materials and the technique used. The most widely used encapsulation techniques are spray-drying (SD) and freeze-drying (FD). Different types of biopolymers can be used as wall materials, such as maltodextrin (MD), starch, Arabic gum, and proteins [24].

Within this context, we encapsulated MAE using the spray-drying method and three different wall materials: maltodextrin, starch, and soy protein. We evaluated the impact of encapsulation process on the antioxidant, antifungal and antiaflatoxigenic effects of MAE. To evaluate the ability of such methods to maintain these activities with time, they were again evaluated after one year of storage at room temperature.

2. Results and Discussion

2.1. Biological Activities of the MAE and Evolution after One-Year Storage (sMAE)

The characterization of the aqueous extract of *Mimosa tenuiflora* bark at time 0 and after one year of storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (sMAE) is shown in Table 1.

Table 1. Characterization of the aqueous extract at time 0 and after one year of storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

	Dry Mass (%)	Polyphenol Content (mg GAE/g DM Extract)	Antioxidant Activity ^b IC50 (mg/L)	Maximum AFB1 Inhibition ^c (%)	Maximum Fungal Inhibition ^c (%)
MAE	11.2	397 ± 22	10	65.7	3
sMAE ^a	11.1	376 ± 2 ^{ns}	12	43.8 [*]	1 ^{ns}

^{ns} no statistically significant change; ^{*} statistically significant change; p -value < 0.05. ^a: sMAE: MAE stored one year at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. ^b: measured using DDPH assay. ^c measured after incubation of *Aspergillus flavus* NRRL 62477 with 0.2 mg DM/mL for 8 days at $27\text{ }^{\circ}\text{C}$.

After one-year storage, no significant changes in the total amount of phenolic compounds nor the antioxidant activity were observed in sMAE. This may be due to the low temperature of storage ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), which helps to preserve the stability of the phenolic compounds. However, regarding AFB1 inhibition, the ability of sMAE to inhibit AFB1 production was strongly reduced. Indeed, maximum AFB1 inhibition went from 65.7% at time 0 to 43.8% after one year. This result highlights the need to improve the storage procedure to maintain biological activity of MAE.

2.2. MAE Spray-Drying Encapsulation

The process yields obtained during spray-drying step both for microparticles with and without MAE, are shown in Table 2.

Table 2. Spray-drying yields for the different wall materials tested.

Composition of the Microparticles	Wall Material/Extract Ratio (w/w Dry Matter)	Spray-Drying Yield (%)
Maltodextrin	100/0	59
Maltodextrin + MAE	50/50	63
Soy protein	100/0	57
Soy protein + MAE	50/50	54
Starch	100/0	58
Starch + MAE	50/50	59

Soy protein isolate showed the lowest spray-drying yield at 57%, followed by starch (58%) and maltodextrin (59%). The spray-drying yields obtained for the microparticles containing the MAE followed the same trend. As for microparticles without MAE, the highest yield was obtained for maltodextrin-based microparticles (63%), followed by starch-based ones (59%) and soy protein-based ones (54%). Spray-drying yield is not frequently reported for natural compounds. It appears that our results are slightly higher than the few previously reported, such as the 51% described for the encapsulation of aqueous bitter melon extract by spray-drying with maltodextrin [25], or the 49% in the case of microparticles prepared with OSA starch to encapsulate Jussara pulp [26].

These yields can be considered promising regarding the use of this process at an industrial scale for the protection of bioactive compounds, especially considering the low amount of dry matter used during the atomization step.

2.3. Particles Characterization

2.3.1. Particles Morphology and Size

The macroscopic aspect of the produced microparticles is shown in Figure 1.

The microparticles produced using maltodextrin were the most homogeneous and appeared lighter in color than the others (Figure 1A). When MAE was incorporated, a brown color was observed for all wall materials (Figure 1D–F). As noted for microparticles made only with support material, those made with maltodextrin appeared mildly lighter and thinner than the others (Figure 1D).

A morphological analysis was carried out to evaluate the characteristics of the microparticles such as shape, surface, as well as their size distribution (Figure 2). Scanning electron microscopy showed that the microparticles are globally spherical, heterogeneous in size and not agglomerated, which is probably related to repulsion by negative charges.

Figure 2 shows that the microparticles had a wrinkled surface, probably because they collapsed in their center. This observation can be explained by the evaporation of water contained in droplets inside the drying chamber during the spraying step [27]. This phenomenon was previously observed in plant protein-based microparticles with low dry

matter content [28]. This could also be related to SEM analysis, which is performed under vacuum which can deform the microparticles [29].

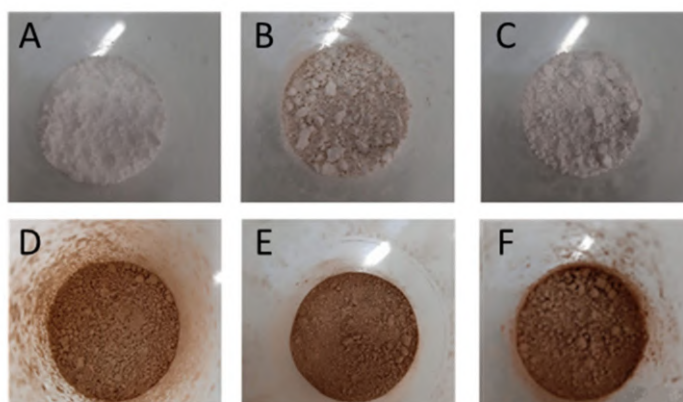


Figure 1. Visual aspect of the powders obtained after atomization in Mini Spray-dryer Buchi B-290 of wall materials alone: maltodextrin (A), soy protein (B), starch (C). Powders obtained after atomization of wall materials together with MAE are presented on the second line: maltodextrin + MAE (D), soy protein + MAE (E), and starch + MAE (F).

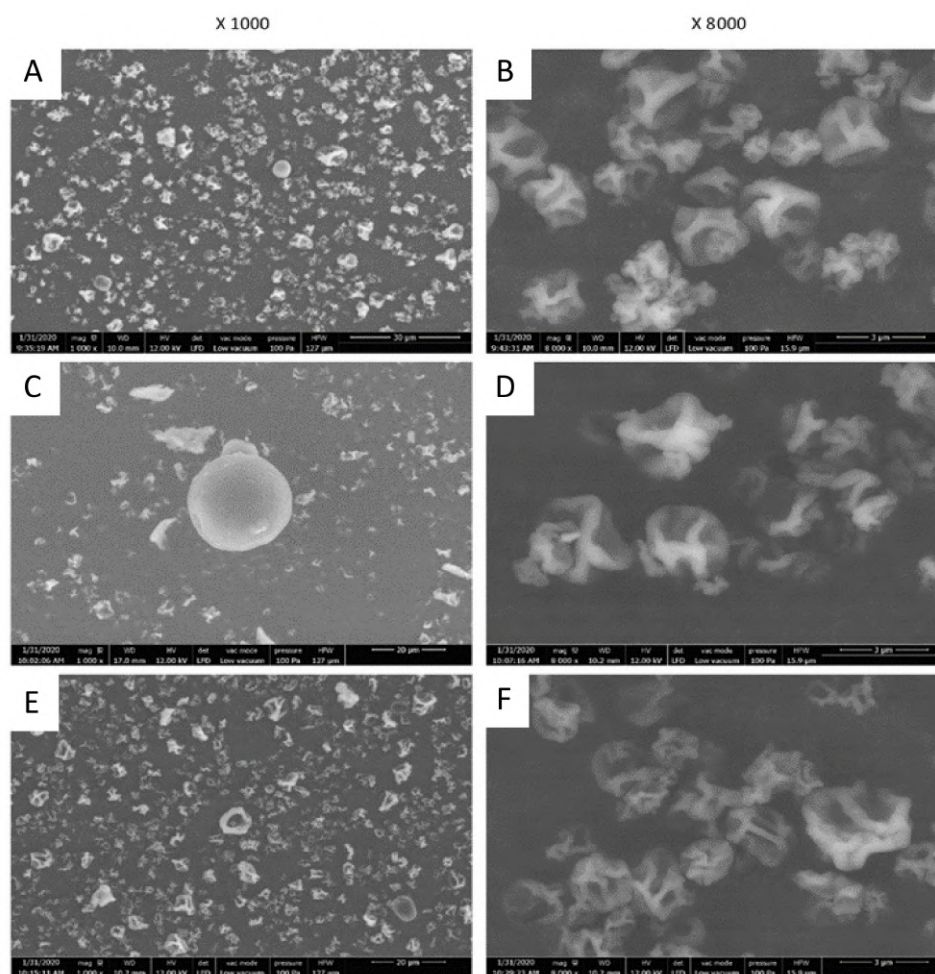


Figure 2. Microparticle analysis by SEM. Observations with a Scanning Electron Microscope of the microparticles obtained after MAE encapsulation in the three wall materials. (A,B) Maltodextrin microparticles with MAE, (C,D) soy protein microparticles with MAE, (E,F) starch microparticles with MAE.

The sizes of microparticles made using polysaccharides as wall material (maltodextrin and starch) were about 3 μm in size. Those based on the use of soy protein were larger and had a less homogeneous size distribution, ranging between 10 and 15 μm and reaching up to 30 μm in some cases. There could be a link between the intrinsic size of the matrix constituent macromolecules and the size of the resulting microparticles. Furthermore, soy protein was more difficult to dissolve than the others; the large particle visible on Figure 2C could be the result of this incomplete dissolution.

2.3.2. Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Wall Material Microparticles

The total polyphenol content and antioxidant activity of the particles made with wall materials only are presented on Table 3.

Table 3. Total polyphenol content and antioxidant activity of wall material microparticles.

Wall Material	Polyphenol Content (mg GAE/g DM)	Antioxidant Activity on DPPH IC50 (mg DM/L)
Maltodextrin	0.7 \pm 0.3	>1000
Soy protein	17.0 \pm 0.4	>1000
Starch	1.9 \pm 0.4	>1000

None of the microparticles with support material presented antioxidant activity. Total polyphenol content in microparticles made with the two polysaccharides (maltodextrin and starch) was not significant. By contrast, the soy protein microparticles showed a polyphenol content of 17 mg GAE/g DM. This value is attributed to the fact that the Folin reagent, used for polyphenol determination, can also react with proteins, as used in the Lowry method for protein determination [30]. However, this value was low compared to values measured in MAE. Moreover, if due to protein interactions, this value shall remain constant and not interfere with the evaluation of the evolution of polyphenol content in microparticles containing MAE with storage time.

2.3.3. Total Polyphenol Content and Antioxidant Capacity of Microparticles with MAE and Evolution after 1 Year of Storage

Table 4 gathers the results of the total polyphenols and antioxidant capacity of the microparticles containing MAE on time 0 and after one year of storage at room temperature. The determination of the polyphenols encapsulation efficiency (PEE) allowed us to demonstrate the capacity of the tested wall materials to preserve the polyphenols during the atomization stage.

Table 4. Polyphenol content and antioxidant activity of the microparticles with MAE and evolution after one-year storage at room temperature.

Wall Material Used	Theoretical Dry Mass of the Extract in the Microparticles (g)	Theoretical Polyphenol Content in Microparticles (mg GAE/g Microparticles)	Time 0			After One-Year Storage ^c	
			Experimental Polyphenol Content in Microparticles (mg GAE/g Microparticles)	PEE ^a (%)	Antioxidant Activity IC50 ^b (mg/L)	Experimental Polyphenol Content in Microparticles (mg GAE/g Microparticles)	Antioxidant Activity IC50 ^b (mg/L)
Maltodextrin	0.65	258	168 \pm 7	65	23	188 \pm 3	27
Starch	0.62	246	214 \pm 8	86	25	211 \pm 3	27
Soy protein	0.62	246	142 \pm 9	58	48	149 \pm 3	79

^a: PEE = Polyphenols encapsulation efficiency. ^b: measured using DDPH assay. ^c: storage at room temperature.

For all the microparticles, the experimental results of the polyphenol determination were lower than the theoretical ones. This could be explained by the matter loss on the apparatus walls during the encapsulation process (both some wall material and compounds belonging to the extract).

Polysaccharide-based microparticles had the highest polyphenols encapsulation efficiency, with 86% and 65% for starch and maltodextrin, respectively. Soy protein-based ones had the lowest efficiency, with 58%. This difference may be due to the polysaccharides' hydrophilic character, making their affinity for an aqueous extract higher than that of soy protein, which is more hydrophobic. The difference between the two polysaccharides may be related to the longer chain molecular structure of starch that can improve the phenolic compounds protection. The microparticles' storage for one year at room temperature did not significantly modify the polyphenol content, whatever the wall material considered.

Only few data are available concerning the encapsulation of natural extracts. Nevertheless, we can compare our results with those obtained during the microencapsulation of phenolic compounds of pomegranate juice by spray-drying, where the microparticles generated with maltodextrin presented a lower polyphenol encapsulation efficiency (54%). By contrast, the microparticles generated with soy protein presented a higher efficiency (76%) [31]. Our results follow the same trend as those reported for the encapsulation of polyphenols of horseradish juice by spray-drying with maltodextrin (75%), starch (77%) and soy protein (56%) [22]. Our results are also comparable with the results described for anthocyanins' encapsulation by spray-drying with sodium alginate as wall material (75%) [21] and of carotenoids by spray-drying with a mixture of maltodextrin and Arabic gum, which presented an efficiency of 77% [32].

The antioxidant capacity of MAE was not modified by encapsulation with the two polysaccharide-based microparticles. Indeed, considering the 50/50 ratio (*w/w*) between the extract and the wall material used for encapsulation, which led to a division of the DM of MAE by two-fold in the microparticles, it seems that the initial antioxidant activity of the aqueous extract was preserved. Moreover, it was not significantly affected by one-year storage at room temperature (Table 4). By contrast, the antioxidant activity of MAE in soy protein-based microparticles was twice lower than that for polysaccharides. This may be due to the fact that antioxidant compounds can interact with proteins, reducing their activity. This observation is even more important after one year of storage, since antioxidant activity decreased again about two-fold, increasing the difference to polysaccharide-based microparticles.

2.4. Antifungal and Antiaflatoxin Activities

2.4.1. Antifungal and Antiaflatoxin Activities of the Wall Material Microparticles

Figure 3 shows the effect of microparticles prepared with wall materials only (no MAE) on the growth and AFB1 production by *A. flavus* NRRL 62477 strain.

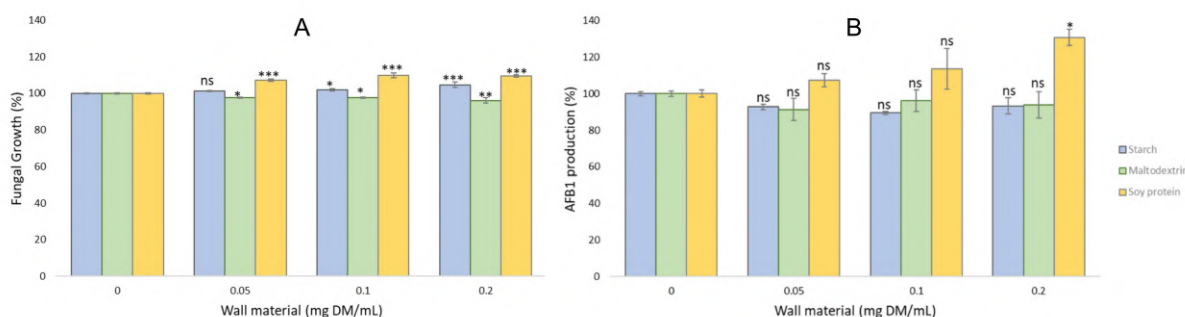


Figure 3. Fungal growth (A) and AFB1 production (B) of *A. flavus* NRRL 62477 strain when exposed to increasing concentrations of the different wall-material microparticles for 8 days at 25 °C: Starch (blue bars), maltodextrin (green bars) and soy protein (yellow bars). Columns with 0 correspond to *A. flavus* NRRL 62477 cultures with no wall materials and are used as control values. Results are expressed as the percentage of fungal growth or AFB1 production compared to untreated control cultures \pm standard error of the mean ($n = 4$). ns = no significant change; * p -value < 0.1; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001.

The addition of increasing concentrations of wall material microparticles mildly modified the growth of *A. flavus*, likely related to the modification of available nutrients in the medium. Maltodextrin led to a slight reduction in growth (less than 4% at the highest tested concentration) whereas the two other wall materials mildly increased fungal growth. However, this had no significant impact on AFB1 production, with the exception of the highest concentration of soy protein microparticles (0.2 mg DM/mL), that slightly increased AFB1 production after 8 days of culture. This can be directly related to the increased fungal development observed at this concentration.

2.4.2. Antifungal and Antiaflatoxin Activities of the Microparticles with MAE and Evolution after One Year pf Storage

The impact of MAE-containing microparticles on both fungal growth and AFB1 production at T0 and after one-year storage are presented on Figure 4.

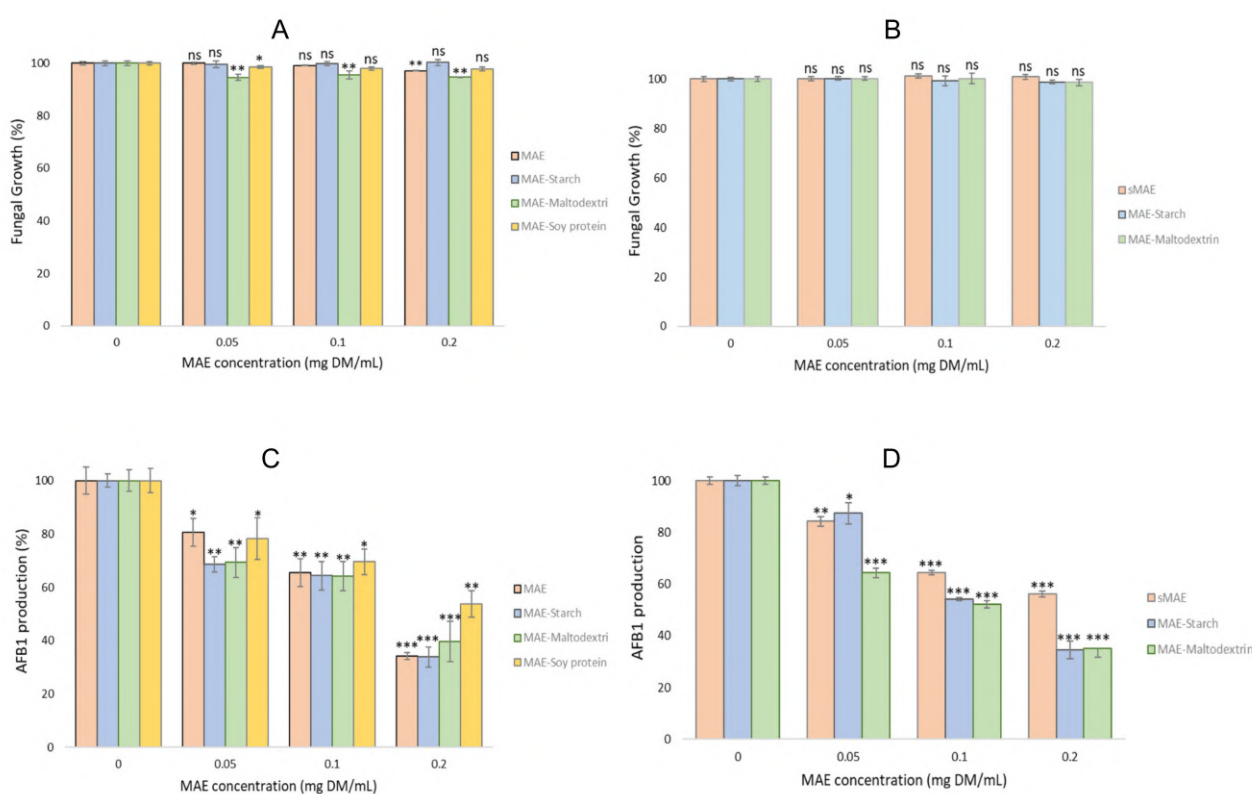


Figure 4. Fungal growth at time 0 (A) and after one-year storage (B). AFB1 production at time 0 (C) and after one-year storage (D). *A. flavus* NRRL 62477 strain was exposed to increasing concentrations of MAE-containing microparticles for 8 days at 27 °C. MAE (A,C) and sMAE (B,D) were used as a positive control at T0 and after one year of storage, respectively. Columns with 0 correspond to *A. flavus* NRRL 62477 cultures with no particles nor MAE or same, and are used as control values. Results are expressed as the percentage of fungal growth or AFB1 production compared to these untreated control cultures \pm standard error of the mean ($n = 4$). ns = no significant change; * p -value < 0.1; ** p -value < 0.01; *** p -value < 0.001.

The impact of MAE-containing microparticles on fungal growth at T0 was very limited (Figure 4A). Indeed, both starch and soy protein had no effect whatever the concentration tested. Only maltodextrin microparticles mildly reduced fungal growth (less than 5%) at all tested concentrations, as observed previously for particles without MAE. After one-year storage, quite comparable results were observed with no effect on fungal growth for both starch and maltodextrin at all tested concentrations. We were not able to test MAE-containing soy-protein microparticles after one year due to a lack of particles. Therefore,

encapsulation of MAE in the different microparticles did not modify its limited impact on fungal growth.

Figure 4C shows the impact of MAE-containing microparticles on AFB1 production in *A. flavus*, compared to the effect of MAE at T0. Microparticles prepared with both polysaccharides had a similar inhibitory effect on AFB1 to MAE. Soy protein-based microcapsules were mildly less efficient in AFB1 inhibition. This could be the result of the balance between the stimulation of AFB1 production observed with soy protein alone (Figure 3B) and the effect of MAE active compounds on AFB1 synthesis.

After one year of storage, MAE-containing microparticles prepared with starch and maltodextrin were still able to inhibit AFB1 synthesis in a dose-dependent manner, with no significant reduction in their efficacy compared to what was observed at T0. By contrast, MAE extract stored for the same time at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ lost part of its activity, since the maximal AFB1 inhibition was about 40% whereas it was higher than 65% at time 0.

In this study, we demonstrated that polysaccharide microparticles were able to preserve anti-AFB1 activity of MAE more efficiently than after storage at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Since microparticles can be stored at room temperature with no special constraints, this may represent a good and energy-saving method of long-term storage of active components to be used on crops. The dry formulation is also of great interest considering grain protection during storage, meaning after a drying step. Indeed, in that case, active molecules from MAE would be released only in cases of moistening, which corresponds to an increase in the risk of fungal development and of subsequent toxin production.

3. Materials and Methods

3.1. Chemicals, Reagents and Encapsulating Agents

All solvents (HPLC grade) (acetonitrile; chloroform and methanol) and chemicals (Tween 80; Folin–Ciocalteu reagent; DPPH reagent; AFB1 standard; starch) were purchased from Sigma–Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Ethanol 96% and sodium carbonate were purchased from VWR International (Fontenay-sous-bois, France). Ultrapure water was prepared using Veolia Purelab Classic (Veolia, Toulouse, France). Maltodextrin Glucidex IT12 was purchased from Roquette (Lestrem, France) and soy protein SUPRO[®]XT219DIP from Solae Belgium NV (Ieper, Belgium).

3.2. Plant Material

The supplier of stem bark of *M. tenuiflora* (Willd.) was Red Mexicana de Plantas Medicinales y Aromaticas (REDMEXPLAM) under the registration number UATX/01/Tepezcohuite/2019 deposited at Jardin Botanique Universitaire UAT. At reception, bark was ground at 1 mm granulometry using a mill and then stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in sealed container.

3.3. Preparation of *M. tenuiflora* Aqueous Extract (MAE)

MAE was prepared as described [14]. *M. tenuiflora* bark was extracted by maceration for 15 h at room temperature. The resultant extract after centrifugation was filtered through Whatmann grade 1 filter paper (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France). The sterilization was carried out at $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 min in an autoclave (SMI group UNICOM, Montpellier, France).

3.4. Dry Matter Content

Dry matter contents were determined for the extract and encapsulating agents by placing them at $103\text{ }^{\circ}\text{C}$ until constant weight, using a Memmert oven (Schabach, Germany).

3.5. MAE Encapsulation by Spray-Drying

Infeed solutions were prepared as follows for all the encapsulating materials: the wall material was added to MAE under mechanical stirring (500 rpm) and the solution was heated at $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 min (still under stirring) to facilitate the solubilization of the

wall material powder. The infeed solutions contained 0.65% (*w/w*) total solids, for a 50:50 core-to-wall ratio.

Freshly prepared solutions were then spray-dried using a Mini Spray-Dryer B-290 (Büchi, Flawil, Switzerland), in the open mode under the following stable conditions: inlet air temperature of 140 ± 4 °C, drying airflow rate of 470 L/h, liquid feed flow rate of 450 mL/h and 100% aspiration. Infeed solutions were maintained under magnetic stirring during the entire spray-drying step. Microparticles collected from the container were sealed in a hermetic opaque packaging and stored for analysis at room temperature. The spray-drying yield was calculated as follows:

$$\text{SP yield} = [\text{mass of microparticles recovered} / \text{Initial solid dry mass}] \times 100, \quad (1)$$

3.6. Polyphenol Encapsulation Efficiency (PEE)

The encapsulation efficiency of the polyphenols was calculated as the experimental content of polyphenols contained in the microparticles in relation to the theoretical content of polyphenols.

$$\% \text{PEE} = [\text{Experimental content of polyphenols in microparticles} / \text{Theoretical content of polyphenols in microparticle}] \times 100 \quad (2)$$

The theoretical polyphenol content in the microparticles was calculated according to the polyphenol content of the extract and its proportional dilution in the wall material.

3.7. Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis

SEM observations of microparticles were performed using a Quanta 450 FEG scanning electron microscope (FEI, Hillsboro, OR, USA) under low vacuum mode at 100 Pa. The microparticles were deposited on conductive double-faced adhesive tape and sputter-coated with silver. They were observed at different magnifications (1000× and 8000×).

3.8. Solubilization of Microparticles for Analyses

The three wall materials are soluble in water, but not very soluble in ethanol. Therefore, the microparticles were first diluted in water, to carry out the tests on the fungus. For the determination of the antioxidant capacity, they were rediluted in ethanol as required by the technique, due to the solubility of the DPPH reagent in ethanol.

3.9. Determination of Total Polyphenol Content

The Folin–Ciocalteu method [33] was applied for the determination of total polyphenols content. The absorbance reading was performed at 700 nm after 45 min incubation time at 45 °C using a spectrophotometer BMG-Labtech SpectrostarNano (BMG LABTECH SARL, Champigny-sur-Marne, France). The results were expressed in milligrams of Gallic Acid Equivalent (GAE) per gram of dry matter.

3.10. Determination of Antioxidant Activity

DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Sigma-Aldrich) free radical was used to determine antioxidant activity of extracts and microparticles [34]. The reagent solution of DPPH in ethanol 96% was adjusted at a 516 nm absorbance of $1 \pm 10\%$ in the same analyzing conditions as the extracts on BMG-Labtech Spectrostar-Nanospectrophotometer (BMG LABTECH SARL, Champigny-sur-Marne, France).

Seven different extract concentrations (150 µL) were incubated with 150 µL DPPH solution for 40 min at room temperature in a 96-well quartz microplate. The reaction equation for each reaction solution of five replicates was:

$$f(C_e)c = 1 - A/A_0 \quad (3)$$

where C_e is the extract concentration (in mg/L), A the extract absorbance, and A_0 is the control absorbance (DPPH) after 40 min incubation. The antioxidant activity is reported as

the inhibitory concentration 50 (IC_{50}), which corresponds to the concentration that inhibits 50% of the DPPH radicals. It is expressed in milligrams of extract per liter (mg/L). The value of IC_{50} was calculated using linear regression, as follows:

$$IC_{50} = 0.5 - a/b \quad (4)$$

where IC_{50} is the half-maximal inhibitory concentration, a is the origin ordinate, and b is the slope.

3.11. Effect of MAE and Microparticles on *Aspergillus Flavus* Growth and Aflatoxin B1 Synthesis

3.11.1. Fungal Strain and Culture Conditions

The strain used for all assays was *Aspergillus flavus* NRRL 62477 [35]. Ten μ L of a spore suspension containing 1000 spores were inoculated centrally into the culture medium for all experiments [14].

The culture medium was made of 18 mL of malt extract agar (Biokar Diagnostics, Allonne, France) and 2 mL of autoclaved MAE or microparticles extracts, prepared at different concentrations by dilution in water. Control cultures were made by adding 2 mL of distilled water to the initial 18 mL of culture medium. Cultures were incubated for 8 days at 27 °C. Each assay was performed in triplicate. After incubation, the growth was evaluated by the measurement of the colony diameter.

3.11.2. Extraction and Quantification of AFB1 by HPLC

AFB1 was extracted from culture media with HPLC-grade chloroform and the supernatants were filtered off. Filtrates (2 mL) were concentrated to dryness at 45 °C using a STUART SBH200D/3 sample concentrator (Stuart equipment, Paris, France), and the residues were redissolved in acetonitrile HPLC grade (2 mL). Finally, the samples were filtered through 0.45 μ m PTFE disk filters (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France) and placed in HPLC vials. AFB1 concentration was quantified by HPLC on an Ultimate 3000 UPLC equipment coupled to fluorescent detector at 365 nm wavelengths for excitation (and 430 nm for emission) (Thermo Fisher Scientific, Illkirch-Graffenstaden, France). Separation was carried out with an EvoC18 column (3 μ m, 150 \times 3.2, Phenomenex, Le Pecq, France) at 27 °C, at a 1.2 mL/min flow of a mixture acetonitrile HPLC grade and water (25:75 *v:v*). Injection volume was 10 μ L.

The identity of the AFB1 was confirmed by checking the UV absorption spectrum thanks to an additional DAD detector in the series. AFB1 concentrations were calculated with an external standard calibration curve in the range of 0.16 to 20 mg/L.

3.12. Statistical Analysis

All data are presented as the mean of the experimental values obtained in quadruplicate. The error values of the data shown in tables as numerical values or in graphs as error bars correspond to the standard error of the mean (SEM) calculated from the standard deviation of the values.

One-way ANOVA was used to determine the differences in the AFB1 production and fungal growth data between the control and treated groups. A *T*-test was used to determine the significant difference between the means of two groups.

Differences were considered statistically significant for *p*-values less than 0.05.

GraphPad Prism 9 software was used to perform all statistical analyzes.

4. Conclusions

This work demonstrates that microencapsulation is a promising process to maintain the antioxidant and antiaflatoxic properties of natural extracts during long periods of storage. Among the wall materials tested here, polysaccharides appear to be the best choice since they are neutral on both fungal growth and toxinogenesis. Further studies are now required to test the applicability of such microparticles on grains during storage.

Author Contributions: Formal analysis and experiments: C.H. and L.C. Conceptualization: V.D., C.M. and J.-D.B. Methodology: V.D., C.M. and J.-D.B. Supervision of experiments: V.D., C.M. and J.-D.B. All authors participated in writing the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnologia (CONACYT) funded the Ph.D. grant of Christopher Hernandez. PhD grant of Laura Cadenillas was supported by the French Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request to the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Not applicable.

References

1. IARC. Fungi Producing Significant Mycotoxins. *IARC Sci. Publ.* **2012**, *158*, 1–30.
2. Wu, F.; Groopman, J.D.; Pestka, J.J. Public Health Impacts of Foodborne Mycotoxins. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2014**, *5*, 351–372. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Frisvad, J.C.; Hubka, V.; Ezekiel, C.N.; Hong, S.-B.; Nováková, A.; Chen, A.J.; Arzanlou, M.; Larsen, T.O.; Sklenář, F.; Mahakarnchanakul, W.; et al. Taxonomy of *Aspergillus* Section *Flavi* and Their Production of Aflatoxins, Ochratoxins and Other Mycotoxins. *Stud. Mycol.* **2018**, *91*, 37–59. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gibb, H.; Devleeschauwer, B.; Bolger, P.M.; Wu, F.; Ezendam, J.; Cliff, J.; Zeilmaker, M.; Verger, P.; Pitt, J.; Baines, J.; et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of Four Foodborne Chemical Toxins, 2010: A Data Synthesis. *F1000Research* **2015**, *4*, 1393. [[CrossRef](#)]
5. Bailly, S.; Mahgubi, A.; Carvajal-Campos, A.; Lorber, S.; Puel, O.; Oswald, I.; Bailly, J.-D.; Orlando, B. Occurrence and Identification of *Aspergillus* Section *Flavi* in the Context of the Emergence of Aflatoxins in French Maize. *Toxins* **2018**, *10*, 525. [[CrossRef](#)]
6. Waliyar, F.; Osiru, M.; Sudini, H.; Njoroge, S. Reducing Aflatoxins in Groundnuts through Integrated Management and Biocontrol. In *Aflatoxins-Finding Solutions for Improved Food Safety*; International Food Policy Research Institute: Washington, DC, USA, 2013; pp. 1–2.
7. Sipos, P.; Peles, F.; Brassó, D.L.; Béri, B.; Pusztahelyi, T.; Pócsi, I.; Györi, Z. Physical and Chemical Methods for Reduction in Aflatoxin Content of Feed and Food. *Toxins* **2021**, *13*, 204. [[CrossRef](#)]
8. FAO. *Worldwide Regulations for Mycotoxins in Food and Feed in 2003*; FAO: Rome, Italy, 2004.
9. Khan, R.; Ghazali, F.M.; Mahyudin, N.A.; Samsudin, N.I.P. Biocontrol of Aflatoxins Using Non-Aflatoxigenic *Aspergillus flavus*: A Literature Review. *J. Fungi* **2021**, *7*, 381. [[CrossRef](#)]
10. Moore, G.G. Sex and recombination in aflatoxigenic *Aspergilli*: Global implications. *Front. Microbiol.* **2014**, *5*, 32. [[CrossRef](#)]
11. Loi, M.; Paciolla, C.; Logrieco, A.F.; Mulè, G. Plant Bioactive Compounds in Pre- and Postharvest Management for Aflatoxins Reduction. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 243. [[CrossRef](#)]
12. Peles, F.; Sipos, P.; Kovacs, S.; Györi, Z.; Pócsi, I.; Pusztahelyi, T. Biological control and mitigation of Aflatoxin contamination in commodities. *Toxins* **2021**, *13*, 104. [[CrossRef](#)]
13. Gomez, J.V.; Tarazona, A.; Mateo-Castro, R.; Gimeno-Adelantado, J.V.; Jimenez, M.; Mateo, E.M. Selected plant essential oils and their main active components, a promising approach to inhibit aflatoxigenic fungi and aflatoxin production in food. *Food Addit. Contam. Part A* **2018**, *35*, 1581–1595. [[CrossRef](#)]
14. Hernandez, C.; Cadenillas, L.; Maghubi, A.E.; Caceres, I.; Durrieu, V.; Mathieu, C.; Bailly, J.-D. *Mimosa Tenuiflora* Aqueous Extract: Role of Condensed Tannins in Anti-Aflatoxin B1 Activity in *Aspergillus flavus*. *Toxins* **2021**, *13*, 391. [[CrossRef](#)]
15. Bastos, R.W.; Rossato, L.; Goldman, G.H.; Santos, D.A. Fungicide effects on human fungal pathogens: Cross resistance to medical drugs and beyond. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1010073. [[CrossRef](#)]
16. Montibus, M.; Vitrac, X.; Coma, V.; Loron, A.; Pinson-Gadais, L.; Ferrer, N.; Verdal-Bonnin, M.-N.; Gabaston, J.; Waffo-Téguo, P.; Richard-Forget, F.; et al. Screening of Wood/Forest and Vine By-Products as Sources of New Drugs for Sustainable Strategies to Control *Fusarium graminearum* and the Production of Mycotoxins. *Molecules* **2021**, *26*, 405. [[CrossRef](#)]
17. Holmes, R.A.; Boston, R.S.; Payne, G.A. Diverse Inhibitors of Aflatoxin Biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *78*, 559–572. [[CrossRef](#)]
18. Caceres, I.; El Khoury, R.; Bailly, S.; Oswald, I.P.; Puel, O.; Bailly, J.-D. Piperine Inhibits Aflatoxin B1 Production in *Aspergillus Flavus* by Modulating Fungal Oxidative Stress Response. *Fungal Genet. Biol.* **2017**, *107*, 77–85. [[CrossRef](#)]
19. Jimenez-Zamora, A.; Delgado-Andrade, C.; Rufian-Hneras, J.A. Antioxidant capacity, total phenols and color profile during the storage of selected plants used for infusion. *Food Chem.* **2016**, *199*, 339–346. [[CrossRef](#)]

20. Zilic, S.; Kocadagli, T.; Vancetovic, J.; Gokmen, V. Effects of baking conditions and dough formulations on phenolic compounds stability, antioxidant capacity and color of cookies made from anthocyanin-rich corn flour. *Food Sci. Technol.* **2016**, *65*, 597–603. [[CrossRef](#)]
21. Zhang, R.; Zhou, L.; Li, J.; Oliveira, H.; Yang, N.; Jin, W.; Zhu, Z.; Li, S.; He, J. Microencapsulation of Anthocyanins Extracted from Grape Skin by Emulsification/Internal Gelation Followed by Spray/Freeze-Drying Techniques: Characterization, Stability and Bioaccessibility. *LWT-Food Sci. Technol.* **2020**, *123*, 109097. [[CrossRef](#)]
22. Tomsone, L.; Galoburda, R.; Kruma, Z.; Durrieu, V.; Cinkmanis, I. Microencapsulation of Horseradish (*Armoracia Rusticana* L.) Juice Using Spray-Drying. *Foods* **2020**, *9*, 1332. [[CrossRef](#)]
23. Dumitrascu, L.; Nicoleta, S.; Borda, D.; Corina, N.; Enachi, E.; Barbu, V.; Aprodu, I. Microencapsulation of Bioactive Compounds from Cornelian Cherry Fruits Using Different Biopolymers with Soy Proteins. *Food Biosci.* **2021**, *41*, 101032. [[CrossRef](#)]
24. Pereira Souza, A.C.; Deyse Gurak, P.; Damasceno Ferreira Marczak, L. Maltodextrin, Pectin and Soy Protein Isolate as Carrier Agents in the Encapsulation of Anthocyanins-Rich Extract from *Jaboticaba pomace*. *Food Bioprod. Processing* **2017**, *102*, 186–194. [[CrossRef](#)]
25. Tan, S.P.; Kha, T.C.; Parks, S.; Stathopoulos, C.; Roach, P.D. Optimising the Encapsulation of an Aqueous Bitter Melon Extract by Spray-Drying. *Foods* **2015**, *4*, 400–419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Lacerda, E.C.Q.; Calado, V.M.D.A.; Monteiro, M.; Finotelli, P.V.; Torres, A.G.; Perrone, D. Starch, Inulin and Maltodextrin as Encapsulating Agents Affect the Quality and Stability of *Jussara Pulp* Microparticles. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *151*, 500–510. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Simon-Brown, K.; Solval, K.M.; Chotiko, A.; Alfaro, L.; Reyes, V.; Liu, C.; Dzandu, B.; Kyereh, E.; Goldson Barnaby, A.; Thompson, I.; et al. Microencapsulation of Ginger (*Zingiber officinale*) Extract by Spray Drying Technology. *LWT-Food Sci. Technol.* **2016**, *70*, 119–125. [[CrossRef](#)]
28. Nesterenko, A.; Alric, I.; Violleau, F.; Silvestre, F.; Durrieu, V. A New Way of Valorizing Biomaterials: The Use of Sunflower Protein for α -Tocopherol Microencapsulation. *Food Res. Int.* **2013**, *53*, 115–124. [[CrossRef](#)]
29. Marisa Ribeiro, A.; Estevinho, B.N.; Rocha, F. Microencapsulation of Polyphenols—The Specific Case of the Microencapsulation of *Sambucus Nigra* L. Extracts—A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2020**, *105*, 454–467. [[CrossRef](#)]
30. Shen, C.-H. Quantification and Analysis of Proteins. In *Diagnostic Molecular Biology*; Shen, C.-H., Ed.; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2019; pp. 187–214. ISBN 978-0-12-802823-0.
31. Robert, P.; Gorena, T.; Romero, N.; Sepulveda, E.; Chavez, J.; Saenz, C. Encapsulation of Polyphenols and Anthocyanins from Pomegranate (*Punica Granatum*) by Spray Drying. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2010**, *45*, 1386–1394. [[CrossRef](#)]
32. Ferreira, L.M.D.M.C.; Pereira, R.R.; Carvalho, F.B.D.; Silva Santos, A.; Ribeiro-Costa, R.M.; Carrera Silva Júnior, J.O. Green Extraction by Ultrasound, Microencapsulation by Spray Drying and Antioxidant Activity of the Tucuma Coproduct (*Astrocaryum Vulgare Mart.*) Almonds. *Biomolecules* **2021**, *11*, 545. [[CrossRef](#)]
33. Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.* **1965**, *16*, 144–158.
34. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M.E.; Berset, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *LWT-Food Sci. Technol.* **1995**, *28*, 25–30. [[CrossRef](#)]
35. El Mahgubi, A.; Puel, O.; Bailly, S.; Tadriss, S.; Querin, A.; Ouadia, A.; Oswald, I.P.; Bailly, J.D. Distribution and Toxigenicity of *Aspergillus* Section *Flavi* in Spices Marketed in Morocco. *Food Control* **2013**, *32*, 143–148. [[CrossRef](#)]

II.5.3 Conclusion

Les résultats obtenus dans ce travail, ont permis de montrer que le procédé d'atomisation est une technique tout à fait adaptée à la protection des composés naturels et de leurs activités biologiques, quel que soit le matériau enrobant utilisé. Cependant, il a également été montré que le matériau enrobant joue un rôle très important dans l'atomisation des extraits actifs. En effet, le matériau enrobant conditionne l'efficacité d'encapsulation des polyphénols, notamment en fonction de l'affinité de l'enrobant avec l'extrait aqueux et des interactions possibles entre ce matériau avec les molécules bioactives. Ainsi, les polysaccharides, principalement l'amidon, se sont avérés être la meilleure option pour protéger les composés phénoliques de l'extrait aqueux de *M. tenuiflora*. La protéine de soja n'a permis qu'une protection plus limitée des composés phénoliques.

Par ailleurs, la nature des matériaux enrobant peut aussi impacter la croissance fongique et l'inhibition de l'AFB1. Il a été montré qu'en fonction de l'enrobant utilisé, une augmentation ou une diminution à la fois de la croissance fongique et de la production d'AFB1 peut être observée. Sur cet aspect, les polysaccharides semblent également les plus pertinents, car ils sont neutres à la fois pour la croissance fongique et la toxigenèse.

Concernant la capacité de protection des composés phénoliques dans le temps, les microparticules générées avec le procédé d'atomisation utilisant des polysaccharides comme matériaux enrobants, ont permis d'inhiber la synthèse d'AFB1 de manière dose-dépendante y compris après un an de stockage, sans réduction significative dans son effet par rapport à celui observé à T_0 . Par contre, l'extrait non formulé conservé pendant la même durée à -20°C a perdu une partie de son activité puisque l'inhibition maximale observée était d'environ 40 % alors qu'elle était supérieure à 65 % à T_0 . Par conséquent, les microparticules de polysaccharides sont apparues capables de préserver l'activité anti-AFB1 de l'extrait plus efficacement que le stockage à -20°C de l'extrait pur.

En plus de ces résultats, qui démontrent l'intérêt de ce type de formulation dans le maintien de la bioactivité, l'utilisation de microparticules permettrait également d'envisager une application agronomique de l'extrait. Tout d'abord, d'un point de vue énergétique, les microparticules peuvent être stockées à température ambiante, ce qui est moins coûteux en énergie que le stockage à basses températures. Deuxièmement, la formulation sèche présente également un grand intérêt tant au niveau du transport et de

la conservation des extraits (avant leurs utilisations sur grains) que du point de vue de leur application sur grains. En effet, cette formulation sèche permettrait de ne libérer les molécules actives de MAE que dans le cas d'une réhumidification éventuelle susceptible d'augmenter le risque de développement fongique et de production ultérieure de toxines.

Dans ce contexte des essais plus appliqués réalisés sur des grains de céréales contaminés par *A. flavus* en présence (ou non) de microparticules de MAE à différents taux d'humidité constitueraient la suite logique de ce travail.

Partie III. Matériel et Méthodes

III.1 Matériel

III.1.1 Plantes

Les matières premières utilisées pour cette étude correspondent à des lots de 20 kilogrammes, achetés directement auprès de l'entreprise Red Mexicana de Plantas Medicinales y Aromaticas (REDMEXPLAM) au Mexique (tableau 26). L'aspect visuel des matières premières utilisées avant tout traitement est présenté sur la figure 28.

Tableau 26. Matières premières utilisées.

Espèce	Partie utilisée	Numéro d'exportation botanique
<i>Mimosa tenuiflora</i>	Cortex	UATX/01/Tepezcohuite/2019
<i>Larrea tridentata</i>	Feuilles	UATX/01/Gobernadora/2019
<i>Lippia graveolens</i>	Feuilles	UATX/01/Oregano/2019

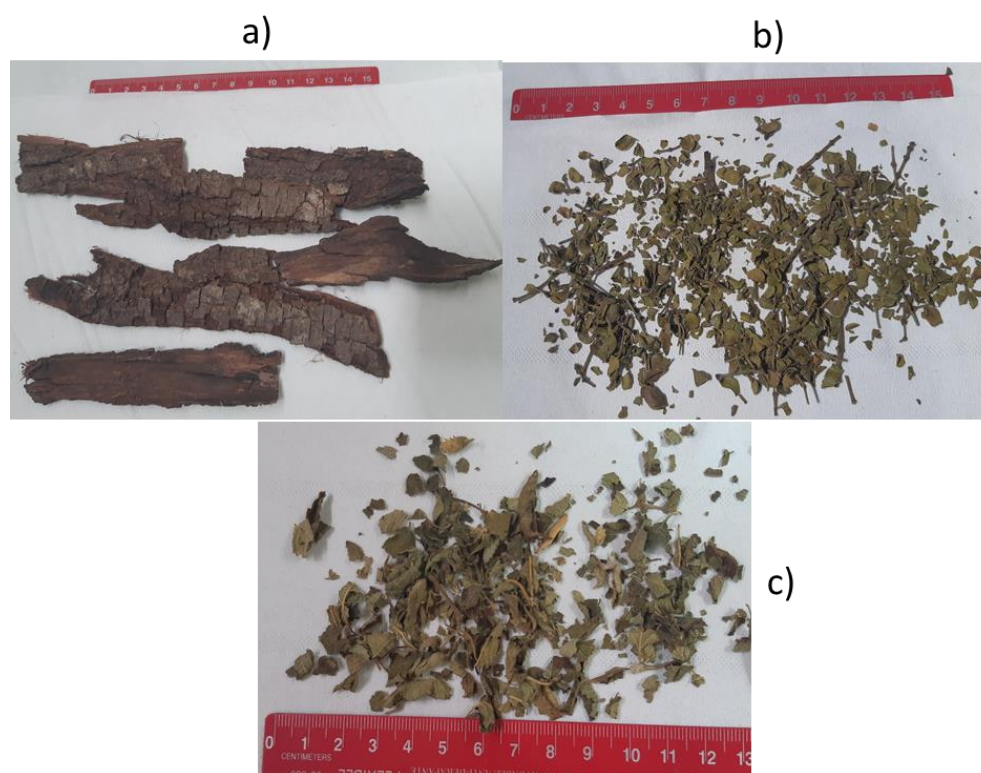


Figure 28. Aspect visuel des matières premières : a) *Mimosa tenuiflora*, b) *Larrea Tridentata*, c) *Lippia graveolens*

III.1.2 Réactifs, matériaux enrobant

Tous les solvants (acide chlorhydrique ; Tween 80 ; chloroforme ; acétonitrile ; acide formique et méthanol) et les produits chimiques proviennent de chez Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). L'éthanol 96% et le carbonate de sodium ont été fournis par VWR International (Fontenay-Sous-Bois, France). Les solvants utilisés dans cette étude étaient de qualité HPLC. L'eau ultra-pure a été préparée à l'aide d'un Veolia Purelab Classic (Veolia, Toulouse, France). Pour les supports d'atomisation, la maltodextrine Glucidex IT12 provient de chez Roquette (Lestrem, France), l'amidon soluble selon Zulkowsky (Cas. No : 9005-84-9) chez Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France) et la protéine de soja SUPRO®XT219DIP de chez Solae Belgium NV (Ieper, Belgique).

III.2 Méthodes

III.2.1 Conditionnement et caractérisation de la matière première et des extraits

III.2.1.1 Broyage de la matière première

A réception, la matière première végétale a été broyée pour en homogénéiser la granulométrie. Pour cela, un broyeur de laboratoire Pulverisette (Fritsch) avec une grille d'exclusion de 10 mm a été utilisé. Le matériel végétal sec et broyé a été conservé dans des pots hermétiques à température ambiante.

III.2.1.2 Détermination de la matière sèche des solides (matières premières) et de liquides (extraits et fractions)

La détermination de la matière sèche (MS) ou de la teneur en matière sèche (MS%) d'un solide a été réalisée par pesée de 3 g de solide dans des creusets avant puis après séchage dans une étuve Memmert (Schwabach, Allemagne) à 103 ± 2 °C pendant 12 h. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicat (NF V 03-921). Après le séchage, le creuset est placé dans un dessiccateur contenant des cristaux de silicate pour éviter toute reprise d'humidité pendant le refroidissement puis la masse est mesurée. Le calcul de la matière sèche (g) d'un échantillon a été réalisé comme suit :

$$MS = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

- Où m_0 : masse du creuset vide et sec (g),
 m_1 : masse du creuset plus l'échantillon avant séchage (g),
 m_2 : masse du creuset plus l'échantillon après séchage (g).

La teneur de matière sèche (%) a été calculée comme suit :

$$\%MS = MS \times 100$$

La détermination de la teneur en matière sèche (MS%) d'un liquide a été réalisée de la même manière que pour la détermination de la matière sèche d'un solide mais en déposant 20 mL du liquide dans les creusets. Le calcul a été fait en utilisant la même équation que celle présentée ci-dessus.

III.2.1.3 Détermination de la matière minérale

La teneur en matières minérales (MM%) a été déterminée en déposant la matière première broyée dans des creusets placés dans un four à calcination à 550°C pendant 3 h, en triplicat. L'échantillon a été ensuite déposé dans un dessiccateur puis pesé à température ambiante. Après la calcination, le résidu est une poudre grise, claire et légère.

La teneur en matières minérales (%) a été calculée de la façon suivante :

$$MM\% = \frac{m_1 - m_0}{m_m \times \%MS}$$

- Où m_1 : masse du creuset après calcination (g),
 M_0 : masse du creuset propre et sec avant calcination (g),
 M_m : masse de la matière déposée (g),
 $\%MS$: teneur de matière sèche masse de la matière première (%).

III.2.1.4 Détermination de la teneur fibres

Pour déterminer la teneur en fibres présentes dans les matières végétales, la méthode dite ADF-NDF a été utilisée. Cette méthode gravimétrique permet de déterminer la teneur en lignines (L), en cellulose (C) et en hémicelluloses (Hc) par leur différence de solubilité dans deux types de détergents et la différence de poids consécutive des échantillons obtenus. Dans un premier temps, les fibres solubles dans un détergent neutre (Neutral Detergent Fiber, NDF), les fibres solubles dans un détergent acide (Acide Detergent Fiber,

ADF), et la teneur en lignine au contact du permanganate de potassium ont été déterminées (Van Soest & Wine, 1967).

Les solutions utilisées dans cette méthode ont été préparées comme suit :

- Réactif NDF : laurylsulfate de sodium (150 g), éthylène diamine tétra-acétate de sodium (93,05 g), phosphate dissodique (22,8 g), borate de sodium décahydraté (34,05 g), éthylcellulose (5 L à 1 %).
- Réactif ADF : Hexadécyltriméthyl ammonium bromide à 2% dans de l'acide sulfurique 1N.
- Réactif au permanganate de potassium : 2 volumes d'une solution de permanganate de potassium saturée pour 1 volume de solution tampon : nitrate de fer (6 g), solution aqueuse de nitrate d'argent à 0,13 % (100 mL), acide acétique glacial (500 mL), acétate de potassium (5 g), alcool butylique tertiaire (400 mL).
- Solution déminéralisante : acide oxalique dihydraté (50 g), éthanol à 95 % (700 mL), acide chlorydrique 12N (50 mL), eau distillée (250 mL).

La figure 29 présente un schéma général de la procédure utilisée pour la détermination des fibres par la méthode ADF-NDF.

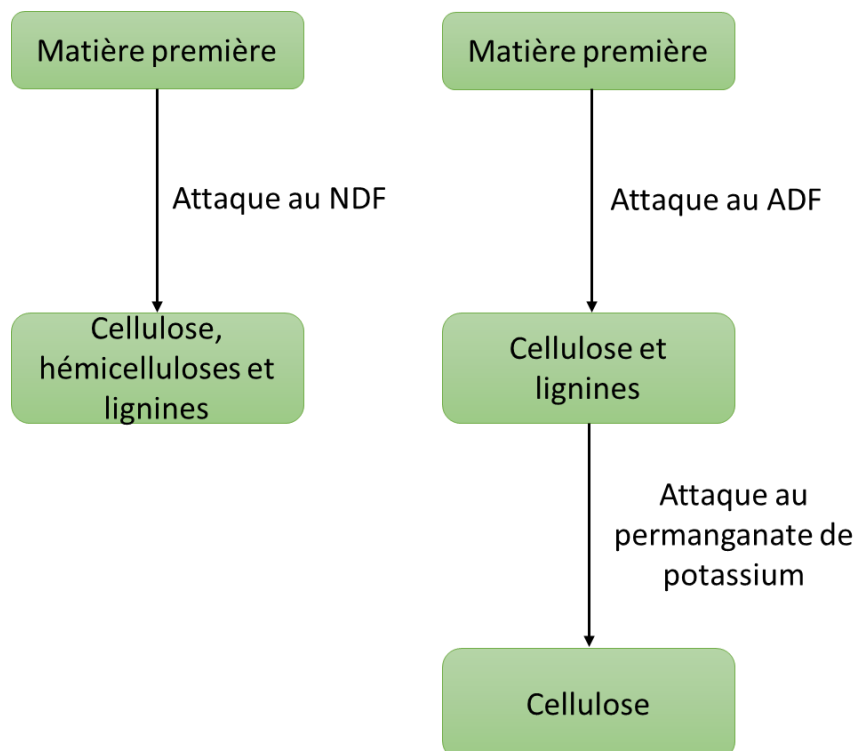


Figure 29. Schéma de la procédure des attaques chimiques effectuées sur la matière première par la méthode ADF-NDF.

Comme présenté sur la figure 29, la méthode se décompose en 2 parties : d'une part, l'attaque avec le détergent neutre (NDF) qui solubilise tous les composants solubles qui ne font pas partie de la paroi, tels que les protéines, les pectines, les extractibles hydrophiles ou lipophiles, etc. La fraction organique résiduelle insoluble représente ainsi la somme des polymères de la paroi : cellulose, hémicelluloses et lignines.

Le détergent utilisé dans l'attaque ADF dissout tous les composés non pariétaux ainsi que les hémicelluloses. Pour cette raison, après attaque à l'ADF, la fraction organique du résidu insoluble est alors constituée uniquement de cellulose et de lignines.

Ces attaques chimiques successives ont été réalisées à l'aide de l'unité d'extraction à chaud Foss Tecator Fibertec M1017 (Nanterre, France) avec système de reflux en ajoutant 100 mL de solution à 1 à 2g de l'échantillon à analyser. Après 1 heure à ébullition, le mélange réactif a été aspiré et le résidu a été rincé à l'eau bouillante jusqu'à disparition de la mousse.

Après les attaques ADF et NDF, les échantillons ont été séchés à l'étuve à 103°C pendant 12 h puis ramenés à température ambiante dans un dessiccateur avant pesée.

Enfin, sur les échantillons traités avec le réactif ADF, une attaque oxydante a été réalisée en ajoutant 25 mL du réactif permanganate de potassium pour éliminer les lignines. Après 1 h 30 de contact et d'agitation, les réactifs ont été éliminés par aspiration et le résidu a été d'abord rincé avec la solution déminéralisante jusqu'à obtention de fibres blanches suivies de deux lavages à l'éthanol et de deux lavages à l'acétone. Chaque analyse a été réalisée en triplicat.

Les calculs ont été effectués par différence de masse à chacune des étapes comme suit :

- Teneur en cellulose :

$$\% C = \frac{(m_{fritté\ 3} - m_{fritté\ 0}) \times (1 - \%MM)}{m_{matière} \times \%MS} \times 100$$

Où $m_{fritté\ 0}$: masse du fritté propre et sec (g),

$m_{fritté\ 3}$: masse du fritté après attaque au permanganate de potassium (g),

$m_{matière}$: masse de la matière première déposée dans le fritté (g),

$\%MM$: teneur de matière minérale (%) de la matière première (%).

- Teneur en lignine :

$$\% L = \frac{(m_{fritté 2} - m_{fritté 3})}{m_{matière} \times \%MS} \times 100$$

Où $m_{fritté 2}$: masse du fritté après attaque au détergent neutre (g).

- Teneur en hémicellulose :

$$\% Hc = \frac{(m_{fritté 2} - m_{fritté 0}) \times (m_{matière} \times \%MS)(\%MM + \%C + \%L)}{m_{matière} \times \%MS} \times 100$$

III.2.1.5 Dosage des protéines

La teneur en protéines a été déterminée à partir de la mesure de l'azote total par la méthode de Kjeldahl selon la norme française NF V 18-100. Ce dosage a été réalisé en triplicat pour chaque matière et s'effectue en deux étapes :

- la minéralisation de l'azote organique contenu dans l'échantillon de matière première en un sel d'ammonium en présence d'une solution alcaline libère de l'ammoniac,
- la titration de l'ammoniaque par un dosage acido-basique.

La minéralisation a eu lieu dans un bloc de minéralisation Foss Tecator Kjeltac 2020 (Nanterre, France), où l'azote des protéines de l'échantillon a été converti en sulfate d'ammonium. Les échantillons ont été préparés la veille en mélangeant chaque échantillon avec de l'acide sulfurique concentré (12,5 mL de H₂SO₄ à 95 %) dans un tube de minéralisation. Le lendemain, deux pastilles de catalyseur (K₂SO₄ + CuSO₄) sont introduites dans le tube avant de minéraliser le mélange à 400°C pendant environ 1h. Durant cette étape, la totalité de l'azote de l'échantillon est transformée en ions ammoniums.

Lors de la distillation, la titration de l'azote minéralisé est nécessaire. Ceci a été réalisé avec le passeur Foss Kjeltac™ 8420 (Nanterre, France) couplé à l'analyseur Foss Kjeltac™ 8400 (Nanterre, France), 80 mL d'eau distillée ont été ajoutés à 50 mL de NaOH à 40 % dans le tube de minéralisation contenant l'échantillon minéralisé. L'ion ammonium (NH₄⁺) a été converti en ammoniaque (NH₃) sous l'action de NaOH, puis l'ammoniaque

est piégée dans un erlenmeyer par barbotage de la vapeur dans 30 ml d'une solution aqueuse d'acide borique à 1%, contenant du vert de bromocrésol et du rouge de méthyle. Ensuite, la titration de l'ammoniaque dans le distillat a été réalisée par une solution d'acide chlorhydrique à 0,05 M ou 0,1 M, selon la teneur estimée dans l'échantillon et la précision de la mesure désirée. Le volume équivalent a été obtenu quand la solution du distillat contenue dans l'erlenmeyer vire du bleu-vert au rose orangé. Pour les blancs, la couleur passe du rose violacé au rose orangé. La teneur en azote (g par 100g de matière sèche) de la matière première a été calculée comme suit :

$$N\% = \frac{(V_{eq} - V_{blanc}) \times N \times M_a}{m_{matiere} \times MS\%}$$

Où M_a : masse molaire de l'azote = 14,007 g/mol,

V_{eq} : volume d'acide utilisé pour la titration de l'échantillon (L),

V_{blanc} : volume d'acide utilisé pour la titration du blanc (L),

N : normalité (mol/L) de l'acide chlorhydrique,

%MS : teneur de matière sèche masse de l'échantillon (%).

Une fois la teneur totale en azote de l'échantillon déterminée, la teneur en protéines a été obtenue en multipliant cette valeur par un coefficient relatif au matériel végétal analysé (AOAC, 1990).

La teneur en protéines (g par 100g de matière sèche) de la matière première a été calculée comme suit :

$$P\% = N\% \times k$$

Où $P\%$: teneur en protéines (%),

k : facteur de conversion de l'azote en protéines, soit 6,25 (AOAC, 1990).

III.2.2 Fractionnement

III.2.2.1 Extraction aqueuse à l'échelle laboratoire

Pour l'extraction à échelle laboratoire, la technique d'extraction utilisée est la macération. Trois g de matière végétale ont été ajoutés à 100 mL d'eau déminéralisée dans un flacon et maintenus sous agitation magnétique (table d'agitation, Thermo Scientific Cimarec i, Massachusetts, USA) pendant 15h à température ambiante. La solution a ensuite été centrifugée à 15000 « relative centrifugal field » (rfc ou g) (Sigma 6-16K Centrifuge, Osterode am Harz, Germany) pendant 15min, puis filtrée sous vide sur papier Whatman n°1 (GE Healthcare Life Sciences, Vélizy-Villacoublay, France). Les filtrats ont été ajustés à 120 ml avec de l'eau déminéralisée. L'extrait aqueux a été enfin stérilisé à 121°C pendant 20 min dans un autoclave SMI group UNICOM (Montpellier, France). L'extraction a été réalisée 5 fois afin d'en déterminer la répétabilité.

III.2.2.2 Extraction aqueuse à l'échelle pilote

Pour l'extraction à échelle pilote, la même méthode que pour l'échelle laboratoire a été utilisée. L'équipement utilisé pour réaliser l'extrait pilote était un réacteur de 5 litres. Pour conserver le ratio S/L, l'extraction a été réalisée en utilisant 4 L d'eau UHQ et 120 g de matière végétale. L'agitation a été assurée par une pale à la vitesse de 80 rpm et l'extraction a duré 15h. Le pilote a été maintenu à 25 °C. La solution a été ensuite centrifugée à 15000 rfc (Sigma 6-16K Centrifuge, Germany) pendant 15min, puis filtrée sous vide (filtration Buchner, papier Whatman n°1). L'extrait aqueux a été enfin stérilisé à 121°C pendant 20 min dans un autoclave SMI group UNICOM (Montpellier, France).

III.2.2.3 Extractions Soxhlet

L'appareil de Soxhlet permet une extraction continue avec un renouvellement régulier du solvant. Dans cette méthode, un volume de 150 mL de solvant a été placé dans un ballon de 250 mL avec trois grains de pierre ponce pour éviter les points chauds. Chaque ballon a été fixé à un appareil de Soxhlet d'une capacité de 125 mL dans lequel une cartouche de cellulose de porosité 0,45 µm contenant 4,5 g de matière végétale broyée a été introduite.

Le temps d'extraction a été fixé à 6 heures selon la méthode de Gutiérrez et al. (1999). La température d'extraction varie en fonction de la température d'ébullition du solvant employé. Le nombre de cycles varie également en fonction du solvant utilisé : plus le

solvant est volatil, plus le cycle est court. Chaque extraction a été réalisée en triplicat pour chaque solvant utilisé : méthanol, acétate d'éthyle et cyclohexane. L'extrait liquide a été ensuite conservé à -24°C.

III.2.2.4 Fractionnement sur résine Amberlite

Pour le conditionnement, 50 grammes de résine adsorbante FPX66 (Rohm and Haas, Philadelphia, PA, USA) ont été mis en suspension dans 250 ml d'eau déminéralisée sous agitation magnétique pour dilater la résine. Cette opération a été réalisée deux fois. Une colonne de verre (ID x L, 3 x 30 cm) munie d'un fritté interne a été remplie avec la résine hydratée. Elle a été ensuite lavée avec 150 ml d'éthanol à 96 % puis avec de l'eau jusqu'à ce que l'éluant soit translucide. Pour finir le prétraitement, la résine a été lavée avec 150 ml d'HCl à 4%, puis lavée avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre un pH neutre. Enfin, la colonne a été lavée avec 150 ml de NaOH 5% puis avec de l'eau distillée jusqu'à atteindre un pH 7. La résine conditionnée représente un volume de lit de 100mL (1BV).

Pour l'adsorption de l'extrait, 200 mL d'extrait aqueux ont été déposés sur la résine conditionnée. Une première élution de la résine a été réalisée avec 400 ml d'eau distillée (4BV) pour éliminer les composés non adsorbés. Dans un second temps, les composés retenus sur la résine ont été désorbés avec 250 mL d'éthanol à 95 % (2,5BV). Les solutions issues de chaque phase (lavage et désorption) ont été récupérées pour être caractérisées (matière sèche, polyphénols totaux, activités biologiques).

III.2.2.5 Fractionnement PVPP

L'extrait et la fraction (2,64 g/L) ont été traités avec de la polyvinylpolypyrrolidone (PVPP) selon la méthode de Peng et al. (2001) avec de légères modifications (Peng et al., 2001). Cinq mL de chaque échantillon ont été mélangés avec 5 mL d'eau et 500 mg de PVPP dans des tubes à essais. Après 30 s de vortex, les échantillons ont été maintenus à 4°C pendant 15 min puis agités à nouveau pendant 30 s avant d'être centrifugés à 3000 g pendant 10 min (Sigma 6-16K Centrifuge, Germany) (Mbacke Dieng et al., 2020). Le surnageant a été ensuite récupéré pour être caractérisé (il est noté sous-fraction « Sf »).

III.2.3 Caractérisations des extraits

III.2.3.1 Détermination des polyphénols totaux

Le contenu de polyphénols totaux a été déterminé par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu, adaptée de la méthode de Singleton et Rossi (Singleton & Rossi, 1965). Cette méthode est basée sur une réaction de réduction d'une solution jaune de complexes polymériques ioniques formés à partir d'acides phosphotungstiques et phosphomolybdiques en un complexe bleu de molybdo-tungstènes par les polyphénols. La réaction a lieu en milieu alcalin, grâce au carbonate de sodium.

La détermination a été effectuée dans une microplaque de 96 puits et en utilisant un lecteur de plaques BMG-Labtech SpectrostarNano (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany). Le blanc a été réalisé en mélangeant le réactif de Folin-Ciocalteu au carbonate de sodium et à l'eau distillée. Une courbe étalon a été réalisée en utilisant l'acide gallique à des concentrations croissantes (0, 10, 25, 50 et 80 mg/L).

Après quelques tests préliminaires, chaque échantillon analysé a été préalablement dilué pour que sa concentration finale en polyphénols totaux soit dans la gamme de concentrations de la courbe d'étalonnage.

Pour effectuer la mesure : 20µl d'étalon de concentration comprise entre 10 et 80 mg/L ou 20µl d'échantillon ont été placés dans un puit avec 10µL de réactif de Folin-Ciocalteu (VWR). La plaque a été agitée pendant 10 secondes, puis 170µL de base Na₂CO₃ à 2,36% ont été ajoutés et la plaque a été agitée de nouveau pendant 10 secondes.

La teneur en polyphénols de chaque échantillon a été mesurée dans 8 puits distincts et l'absorbance a été mesurée à 700 nm et 45°C pour un temps de réaction de 45 minutes.

La concentration en polyphénols d'un extrait est déterminée en rapportant l'absorbance de l'extrait sur la courbe étalon obtenue pour l'acide gallique. Elle est exprimée en Equivalent Acide Gallique (EAG).

$$x = y - b/m$$

Où x : concentration (mg/L Equivalent Acide Gallique (EAG)),

y : absorbance,

b : ordonnée à l'origine,

m : pente de la droite.

La teneur en polyphénols (mg EAG / g d'extrait sec) de l'extrait a été calculée comme suit :

$$C_p = \frac{PP_{mél} \times V_{mél} \times d_{ext}}{V_{ext} \times MS_{ext}}$$

Où C_p : teneur CP en polyphénols (mg EAG / g d'extrait sec),

$PP_{mél}$: concentration en polyphénols dans le mélange réactionnel (mg EAG / L),

$V_{mél}$: volume du mélange réactionnel (L),

d_{ext} : dilution de l'extrait brut avant le mélange réactionnel,

V_{ext} : volume d'extrait dilué dans le mélange réactionnel (L),

MS_{ext} : matière sèche de l'extrait (g/L).

III.2.3.2 Détermination de la teneur en tanins condensés

La teneur en tanins condensés des échantillons a été déterminée en adaptant la méthode de Waterman et Mole (Waterman & Mole, 1994). Les échantillons ont été d'abord dilués avec de l'eau pour obtenir une absorbance d'environ 0,2 après hydrolyse. A chaque échantillon de 2 mL ont été ajoutés 1 mL d'eau distillée et 3 mL d'acide chlorhydrique concentré (12 N) dans deux tubes à essai, un non chauffé (échantillon témoin) et un chauffé. Ce dernier a été maintenu à 100 °C pendant 30 min tandis que le tube témoin était immergé pendant la même durée dans de la glace pilée. Le tube à essai chauffé a été ensuite récupéré et refroidi sur de la glace pilée. Un volume de 0,5 ml d'éthanol a été ajouté à chaque tube et les tubes ont été vortexés pendant 10 s. L'absorbance à 550 nm des contrôles et des essais a été mesurée en utilisant un spectrophotomètre Shimadzu UV1800 (Shimadzu Corp., Kyoto, Japon). La concentration en tanins condensés a été calculée comme suit :

$$T = \frac{[0,3866 \times (A_e - A_t)d_{ext}]}{MS_{ext}}$$

Où T : teneur en tanin (mg / g),

A_e : absorbance d'échantillon,

A_t : absorbance de témoin,

d_{ext} : dilution de l'extrait brut avant le mélange réactionnel,

MS_{ext} : matière sèche de l'extrait (g/L).

L'hydrolyse a été effectuée en triplicat pour chaque échantillon, et les résultats sont exprimés en mg de tanins condensés par g de MS.

III.2.3.3 Détermination de l'activité antioxydante

L'activité antioxydante des extraits a été déterminée avec le radical 2,2-diphényl-1-picrylhydrazyle ou DPPH (Brand- Williams et al., 1995).

Cette méthode évalue la capacité d'un mélange de composés à neutraliser les radicaux libres du DPPH par le transfert d'atomes d'hydrogène provenant des agents antioxydants du mélange. Cette réaction induit une diminution de l'absorbance du DPPH de couleur violette qui peut être quantifiée par spectrophotométrie. Elle s'exprime par la concentration minimale inhibitrice de 50 % des radicaux DPPH présents dans le milieu réactionnel (IC_{50} en mg/L).

Avant d'analyser les échantillons, une solution de DPPH (Sigma-Aldrich) dans l'éthanol 96% a été préparée pour obtenir une absorbance comprise entre 0,9 et 1,1 à 516 nm.

Pour effectuer la mesure en microplaque de quartz de 96 puits, 150 μ L du solution DPPH ont été ajoutés à une quantité de 20 à 150 μ L d'échantillon et d'éthanol pour arriver à un volume total de 300 μ L par puits. L'éthanol a été utilisé comme blanc et un mélange de 150 μ L du solution DPPH et 150 μ L d'éthanol a été utilisé comme standard.

Pour chaque extrait, sept concentrations différentes ont été évaluées et, pour la même dilution d'extrait, cinq répliquats ont été analysés. L'absorbance a été mesurée à 516 nm

après 45 minutes d'incubation à l'obscurité (lecteur de plaques BMG-Labtech Spectrostar-Nano, BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Germany).

L'activité antiradicalaire a été déduite d'une courbe réponse tracée selon la fonction suivante :

$$f(MS_i) = 1 - \frac{A}{A_0}$$

Où MS_i : concentration de chaque solution d'extrait (g/L),

A : Absorbance du mélange réactionnel,

A_0 : Absorbance de DPPH.

L'activité antiradicalaire d'un extrait est évaluée par rapport à la valeur de la Concentration Inhibitrice à 50% des radicaux DPPH (IC_{50}) à 45 min, c'est-à-dire la concentration (mg/L) nécessaire pour réduire la moitié des molécules de DPPH présentes dans le milieu réactionnel. Ainsi, plus la valeur d' IC_{50} est faible, plus l'activité antiradicalaire d'un extrait est élevée. L' IC_{50} a été déterminée comme suit :

$$IC_{50} = 0,5 - \frac{\text{ordonnée à l'origine}}{\text{pente}}$$

III.2.3.4 Tests sur *Aspergillus flavus*

III.2.3.4.1 Souche fongique et conditions de culture

La souche *Aspergillus flavus* NRRL 62477 a été utilisée pour tous les essais (El Mahgubi et al., 2013). Pour toutes les expériences, 10 μ L d'une suspension de spores préparée dans du Tween 80 à partir d'une culture de 7 jours d'*A. flavus* (10^5 spores/mL) ont été inoculées centralement sur milieu MEA (18 mL d'extrait de malt agar (Biokar Diagnostics, Allone, France) additionné de 2 mL de concentrations croissantes d'extrait ou de fraction préalablement stérilisés). Les cultures contrôles ont été préparées en ajoutant le même volume d'eau distillée. Les cultures sont incubées pendant 8 jours à 27°C. Après incubation, la croissance a été quantifiée par une mesure du diamètre de la colonie. Chaque mesure a été réalisée en triplicat.

III.2.3.4.2 Extraction et quantification de l'aflatoxine B1 par HPLC

L'extraction et la quantification de l'AFB1 ont été réalisées comme décrit par El Khoury et al. (2017) avec quelques modifications mineures.

Pour réaliser l'extraction de l'AFB1, après 8 jours de culture, les milieux ont été complètement récupérés et transférés dans des flacons pour être extraits avec 30 ml de chloroforme absolu de qualité HPLC. Les extraits ont été placés pendant 2 h sur une table d'agitation horizontale à 200 rpm et les surnageants ont été ensuite filtrés sur séparateur de phases Whatman 1PS (GE Healthcare Life Sciences, Vélizy-Villacoublay, France). Deux mL de filtrat ont été évaporés à sec dans un concentrateur d'échantillons STU-ART SBH200D/3 (Stuart, Paris, France) à 45°C. Les échantillons ont été resolubilisés dans 2 mL d'acétonitrile puis filtrés sur filtres seringue PTFE de 0,45 µm (Thermo Scientific Fisher, Ville-bon-Sur-Yvette, France) et placés dans des flacons HPLC.

L'AFB1 a été séparée à l'aide d'une chaîne UPLC Ultimate 3000 (Thermo Scientific, France) en utilisant une colonne EvoC18 (3 µm, 150 x 3.2, Phenomenex, Le Pecq, France) conditionnée à 27°C. Le programme d'élution utilisé pour la séparation consiste en un mélange isocratique composé d'acétonitrile et d'eau (25 : 75 v : v). La phase mobile a un débit de 1,2 mL/min et le débit est maintenu pendant 25 min. Le volume d'injection était de 10 µL. L'AFB1 a été détectée à l'aide d'un détecteur à fluorescence à des longueurs d'onde d'excitation de 365 nm et d'émission de 430 nm. L'identité de la molécule a été confirmée par le temps de rétention du standard et en analysant le spectre d'absorption UV grâce à un détecteur à barrette de diodes (DAD) couplé au système (λ max = 224,266,362). Les niveaux de production d'AFB1 ont été calculés sur la base d'une courbe d'étalonnage externe réalisée avec un standard d'AFB1 (gamme de concentrations allant de 0,16 à 20 mg/L).

$$x = y - b/m$$

Où x : concentration (mg/L),

y : absorbance,

b : ordonnée à l'origine,

m : pente de la droite.

Même dans un environnement contrôlé, une même souche d'*A. flavus* peut produire des quantités différentes d'AFB1. Afin de pouvoir comparer l'effet réel des extraits sur la production d'AFB1, nous avons exprimé les valeurs d'activité antiaflatoxigène et antifongique présentées dans ce manuscrit en pourcentage par rapport au témoin.

Pour celle la, la valeur brute de production d'AFB1 a été calculée à partir de l'équation de la droite obtenue par la courbe d'étalonnage. Le pourcentage de production d'AFB1 apres culture en présence de chaque extrait a été calculé selon l'équation suivante :

$$\%AFB1_{\text{échantillon}} = \frac{AFB1_{\text{échantillon}} \times 100}{AFB1_{\text{témoin}}}$$

Où $\%AFB1_{\text{échantillon}}$: Pourcentage de roduction d'AFB1 à partir d'*A. flavus* avec une concentration d'extrait spécifique (%).

$AFB1_{\text{échantillon}}$: Production d'AFB1 à partir d'*A. flavus* avec une concentration d'extrait spécifique ($\mu\text{g AFB1/}$ boîte de Pétri).

$AFB1_{\text{témoin}}$: Production d'AFB1 à partir d'*A. flavus* du témoin ($\mu\text{g AFB1/}$ boîte de Pétri).

III.2.4 Encapsulation

Tout d'abord, une solution appelée solution d'alimentation a été préparée de la même manière pour tous les matériaux enrobants. L'extrait aqueux de *M. tenuiflora* et le matériau enrobant ont été mélangés sous agitation mécanique (500 rpm) à 70 °C pendant 30 min pour faciliter la solubilisation du matériau enrobant dans l'extrait. Les solutions d'alimentation contenaient 0,65% (p/p) de solides totaux, pour un rapport en matière sèche extrait/matériau enrobant de 50/50.

Les solutions fraîchement préparées ont été séchées par atomisation grâce à un Mini Spray-Dryer B-290 (Büchi, Flawil, Suisse), en mode ouvert dans les conditions stables suivantes : température d'entrée d'air de $140 \pm 4^\circ\text{C}$, température de sortie d'air de $75 \pm 4^\circ\text{C}$, débit d'air de séchage de 470L/h, débit d'alimentation en liquide de 450 mL/h et aspiration à 100 %.

Les solutions d'alimentation ont été maintenues sous agitation magnétique pendant toute l'étape de pulvérisation. Les microparticules recueillies dans le conteneur ont été conservées dans un emballage opaque et hermétique et elles ont été stockées à température ambiante jusqu'à analyse

***CONCLUSION GÉNÉRALE ET
PERSPECTIVES***

Soixante ans après sa découverte, la contamination des aliments par l'AFB1 reste encore un enjeu majeur de santé publique en raison de sa toxicité. Ces dernières années, les inquiétudes concernant la contamination par l'AFB1 ont même augmenté à cause des changements climatiques qui ont entraîné l'émergence de cette toxine dans des zones jusque-là indemnes comme l'Europe. Pour cette raison, de nombreuses stratégies sont mises en œuvre pour limiter la contamination par l'AFB1 et/ou les effets néfastes de la molécule. Elles peuvent se situer à trois niveaux : la prévention, la décontamination et la détoxification. Cependant, ces stratégies demeurent insuffisantes pour empêcher complètement la présence d'AFB1. Par conséquent, le développement de nouvelles stratégies écologiques pour compléter, renforcer ou remplacer les stratégies existantes pour contrôler la contamination des aliments par l'AB1 est toujours nécessaire.

L'utilisation de composés végétaux pour lutter contre cette contamination est apparue, au cours des dernières années, comme l'une de ces stratégies alternatives prometteuses. En effet, de nombreuses études ont montré que les extraits de certaines herbes, épices et plantes présentent une activité antifongique et/ou anti-aflatoxigène. Cependant, ce potentiel n'est pas encore utilisé dans les pratiques agricoles et industrielles de la chaîne de production alimentaire.

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce travail de thèse était de tester la capacité des extraits de plantes endémiques du Mexique à inhiber la production d'AFB1.

Trois plantes, *M. tenuiflora*, *L. tridentata* et *L. graveolens*, ont été évaluées et leurs extraits aqueux ont montré une bonne capacité à bloquer la synthèse d'AFB1 sans inhiber la croissance du champignon. Ce dernier point est particulièrement intéressant car de tels extraits pourraient bloquer la synthèse d'AFB1 sans nécessairement altérer l'équilibre fongique de l'écosystème, évitant ainsi la colonisation des substrats par d'autres champignons opportunistes (potentiellement plus nuisibles). De plus l'absence d'effet sur la croissance et donc l'absence de pression de sélection limite le risque de voir émerger des résistances, comme cela peut être le cas pour des composés antifongiques.

Parallèlement, les extraits aqueux des trois plantes étudiées présentent une forte capacité antioxydante, liée à une teneur élevée en composés phénoliques.

Il faut souligner que les trois extraits aqueux ont été obtenus à partir de différentes espèces végétales, mais aussi de différentes parties de chacune des plantes utilisées:

écorce pour *M. tenuiflora* et feuilles pour *L. tridentata* et *L. graveolens*. Afin de voir si les composés impliqués dans les activités biologiques sont communs ou différents, ces extraits ont été fractionnés et caractérisés pour en isoler différentes classes de composés, et en particulier de type phénolique.

Il ressort de ces essais, et comme attendu à la lumière des données disponibles (Bashyal et al., 2017; Cortés-Chitala et al., 2021), que la composition des extraits aqueux, et donc les molécules actives, ne sont pas les mêmes. Chez *M. tenuiflora*, ce sont les tanins condensés qui semblent être les composés responsables de la majeure partie de l'activité biologique. Ce constat est cohérent avec l'origine « écorce » du végétal utilisé.

Pour *L. tridentata* et *L. graveolens*, bien que les extraits aient été préparés à partir de la même partie des plantes (feuilles), là encore, les données de fractionnement de ces deux extraits aqueux, montrent qu'il existe des différences dans la nature des polyphénols qui composent la fraction active.

Nos essais démontrent qu'il existe un lien entre la capacité des extraits aqueux et de leurs fractions actives (polyphénols) à inhiber la production d'AFB1 chez *A. flavus* et leur activité antioxydante.

Il serait donc maintenant très intéressant de caractériser plus précisément la nature des composés phénoliques présents dans les différents extraits en lien avec leur activité antioxydante et leur activité anti-AFB1.

L'identification des composés les plus actifs pourrait ouvrir plusieurs perspectives intéressantes :

- Identifier des plantes dont la teneur en ces composés est importante et qui pourraient donc être de bonnes candidates par une utilisation comme outil de prévention de la contamination aflatoxique. La multiplication des plantes ressources pourrait permettre, en effet, de fournir des « outils » aux petits producteurs partout dans le monde, en mettant à profit la flore disponible localement et ses propriétés. Là encore, l'utilisation d'extraits aqueux obtenus par macération est un avantage important puisqu'ils peuvent être réalisés très facilement, sans solvant ni matériel sophistiqué.
- Identifier des sous-produits riches en ces composés qui pourraient être revalorisés dans la lutte contre la contamination mycotoxique des aliments. En effet, de

nombreux sous-produits agricoles contiennent des composés phénoliques, parfois en quantité importante, et pourraient ainsi être valorisés dans cette stratégie de lutte contre l'AFB1

L'identification précise de la relation structure-fonction des composés actifs pourrait aussi permettre une approche mécanistique plus précise de l'inhibition de la toxino-génèse.

En effet, nous avons montré pour l'extrait de *Mimosa tenuiflora* que son effet passait par une inhibition transcriptionnelle des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse de l'AFB1. Nous avons aussi montré que, en amont de ce cluster, d'autres gènes impliqués dans certaines voies métaboliques (en particulier la réponse au stress oxydant) pouvaient être impactés. Cependant, les essais réalisés avec un extrait complexe ne permettent pas de faire un lien direct de cause à effet. L'identification des voies moléculaires permettant d'éteindre la production d'AFB1 pourrait, à terme, fournir de nouvelles cibles permettant le contrôle de la contamination des aliments, en stimulant certaines fonctions spécifiques chez les espèces toxino-gènes.

Enfin, nos travaux ont été réalisés sur l'AFB1, en utilisant une souche bien caractérisée d'*A. flavus*. Il semblerait maintenant important de vérifier que leur efficacité peut être retrouvée en utilisant d'autres souches de cette espèce mais aussi d'autres souches d'autres espèces de la section *Flavi*, productrices d'AFB1 ainsi que des autres types d'aflatoxines (AFB2, G1 et G2) voire de l'acide cyclopiazonique. Ainsi, tester l'effet de ces extraits sur la toxino-génèse chez *A. parasiticus*, une autre espèce fréquemment impliquée dans la contamination des aliments, semble maintenant une étape importante pour confirmer l'intérêt de ces composés.

En parallèle, puisque qu'il semble que le stress oxydant joue un rôle majeur dans les effets antimycotoxiques observés et qu'il agit en amont de la biosynthèse, il semblerait aussi très intéressant d'évaluer l'effet de ces extraits sur d'autres mycotoxines. Dans ce contexte, une stratégie serait d'évaluer leur effet sur des toxines ayant des voies de biosynthèse assez proches de celle de l'AFB1, c'est-à-dire produites selon la voie des polycétoacides comme par exemple la citrinine ou la patuline, qui peuvent aussi être produites par des espèces du genre *Aspergillus*.

Dans la dernière partie de cette thèse, afin d'évaluer la faisabilité d'une application agronomique, l'extrait de *M. tenuiflora* a été microencapsulé avec différents polymères naturels comme matériau d'enrobage. Cela a permis de démontrer que le procédé d'atomisation est une technique très intéressante pour la protection des composés et de leurs activités biologiques. Il est aussi apparu que le matériau d'enrobage joue un rôle très important. L'amidon est, parmi les matériaux enrobants testés, la meilleure option pour protéger les composés phénoliques d'un extrait aqueux de *M. tenuiflora*. La protéine de soja semble, elle, moins efficace.

Ainsi, les microparticules à base de polysaccharides se sont avérées capables de préserver l'activité anti-AFB1 de l'extrait plus efficacement que le stockage à -20°C.

Il serait maintenant intéressant d'approfondir l'étude de la formulation des extraits sous forme de microparticules. En premier lieu, il est nécessaire d'optimiser le procédé d'atomisation, d'essayer d'autres enrobants de nature différente et dans des proportions variables d'enrobage/extrait sec pour déterminer les conditions optimales. En second lieu, il semble maintenant pertinent de réaliser des essais à l'échelle du grain entier afin de caractériser l'importance de l'inhibition de la toxino-génèse et la cinétique de libération des composés actifs en fonction de l'activité en eau du milieu. De tels essais amèneront aussi à envisager les conditions de répartition de ces microparticules au sein des grains, point très important puisque la contamination fongique et mycotoxique est presque toujours hétérogène et que son contrôle nécessitera donc une répartition parfaitement homogène des produits inhibiteurs.

Il ressort néanmoins de ces travaux que la stratégie de lutte contre la contamination aflatoxique par l'usage de composés issus de plantes est prometteuse et pourrait fournir à terme une alternative intéressante aux stratégies actuelles, facilement utilisable partout dans le monde et en particulier par les petits producteurs et compatibles avec une approche plus durable de l'agriculture.

RÉFÉRENCES

- Abbas, H. K., Zablutowicz, R. M., Bruns, H. A., & Abel, C. A. (2006). Biocontrol of aflatoxin in corn by inoculation with non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Biocontrol Science and Technology*, 16(5), 437-449. <https://doi.org/10.1080/09583150500532477>
- Abbas, H., Weaver, M., Horn, B., Carbone, I., Monacell, J., & Shier, W. (2011). Selection of *Aspergillus flavus* isolates for biological control of aflatoxins in corn. *Toxin Reviews*, 30, 59-70. <https://doi.org/10.3109/15569543.2011.591539>
- Abbas, H., Wilkinson, J., Zablutowicz, R., Accinelli, C., Abel, C., Bruns, H., & Weaver, M. (2009). Ecology of *Aspergillus flavus*, regulation of aflatoxin production, and management strategies to reduce aflatoxin contamination of corn. *Toxin Reviews*, 28, 142-153. <https://doi.org/10.1080/15569540903081590>
- Abbaszadeh, S., Sharifzadeh, A., Shokri, H., Khosravi, A. R., & Abbaszadeh, A. (2014). Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. *Journal de Mycologie Médicale*, 24(2), 51-56. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2014.01.063>
- Abd El-Aziz, A. R. M., Mahmoud, M. A., Al-Othman, M. R., & Al-Gahtani, M. F. (2015). Use of selected essential oils to control aflatoxin contaminated stored cashew and detection of aflatoxin biosynthesis gene. *The Scientific World Journal*, 2015, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2015/958192>
- Abdulrazzaq, Y. M., Padmanabhan, R., Bastaki, S., Kochyil, J., & Shafiullah, M. (2011). Teratogenic Effects of Aflatoxin B1 in Mice Exposed in Early and Late Gestation. *Pediatric Research*, 70(5), 405-405. <https://doi.org/10.1038/pr.2011.630>
- Agbetiameh, D., Ortega-Beltran, A., Awuah, R. T., Atehnkeng, J., Islam, M. S., Callicott, K. A., Cotty, P. J., & Bandyopadhyay, R. (2019). Potential of Atoxigenic *Aspergillus flavus* Vegetative Compatibility Groups Associated With Maize and Groundnut in Ghana as Biocontrol Agents for Aflatoxin Management. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2069 <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02069>
- Agra, M. F., Baracho, G. S., Nurit, K., Basilio, I. J. L. D., & Coelho, V. P. M. (2007). Medicinal and poisonous diversity of the flora of « Cariri Paraibano », Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(2), 383-395. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.12.007>
- Aleon, D., Le Bayon, I., & Chanrion, P. (2005). Note d'information sur les développements fongiques après traitement thermique. *Note d'information CTBA*.
- Alshannaq, A. F., & Yu, J. H. (2020). A Liquid Chromatographic Method for Rapid and Sensitive Analysis of Aflatoxins in Laboratory Fungal Cultures. *Toxins*, 12(2), 93. <https://doi.org/10.3390/toxins12020093>
- Amaike, S., & Keller, N. P. (2011). *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 49(1), 107-133. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095221>

- Ansari, M. S., Moraiet, M. A., & Ahmad, S. (2014). Insecticides : Impact on the Environment and Human Health. In: Malik A., Grohmann E., Akhtar R. (eds) *Environmental deterioration and human health*. Springer, Dordrecht. 99-123. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7890-0>
- Anton, R., Jiang, Y., Weniger, B., Beck, J. P., & Rivier, L. (1993). Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. *Journal of Ethnopharmacology*, 38(2-3), 153-157. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(93\)90010-3](https://doi.org/10.1016/0378-8741(93)90010-3)
- Ariño, A., Herrera, M., Estopañan, G., Rota, M. C., Carramiñana, J. J., Juan, T., & Herrera, A. (2009). Aflatoxins in bulk and pre-packed pistachios sold in Spain and effect of roasting. *Food Control*, 20(9), 811-814. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.10.013>
- Arteaga, S., Andrade-Cetto, A., & Cárdenas, R. (2005). *Larrea tridentata* (Creosote bush), an abundant plant of Mexican and US-American deserts and its metabolite nordihydroguaiaretic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(3), 231-239. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.02.002>
- Ashiq, S., Hussain, M., & Ahmad, B. (2014). Natural occurrence of mycotoxins in medicinal plants : A review. *Fungal Genetics and Biology*, 66, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2014.02.005>
- Asim, M., Sarma, M. P., Thayumanavan, L., & Kar, P. (2011). Role of aflatoxin B1 as a risk for primary liver cancer in north Indian population. *Clinical Biochemistry*, 44(14-15), 1235-1240. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2011.07.017>
- Azmir, J., Sarker, M. Z., Rahman, M., Khan, M. S., Awang, M., Ferdosh, S., Jahurul, M., Ghafoor, K., Norulaini, N., & Omar, A. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials : A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.01.014>
- Azwanida, N. (2015). A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. *Medical Aromatic Plants*, 4(3), 1-6. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000196>
- Bailly, S., Mahgubi, A., Carvajal-Campos, A., Lorber, S., Puel, O., Oswald, I., Bailly, J.-D., & Orlando, B. (2018). Occurrence and Identification of *Aspergillus* Section *Flavi* in the Context of the Emergence of Aflatoxins in French Maize. *Toxins*, 10(12), 525. <https://doi.org/10.3390/toxins10120525>
- Bandyopadhyay, R., Cardwell, K., Ortega-Beltran, A., Schulthess, F., Meikle, W., Setamou, M., & Cotty, P. (2019). Identifying and managing plant health risks for key African crops : Maize. In : Neuenschwander, P. and Tamo, M. (eds) *Critical issues in plant health*. Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing Limited. 173-212. <https://doi.org/10.19103/AS.2018.0043.08>
- Bandyopadhyay, R., Ortega-Beltran, A., Akande, A., Mutegi, C., Atehnkeng, J., Kaptoge, L., Senghor, A. L., Adhikari, B. N., & Cotty, P. J. (2016). Biological control of aflatoxins in Africa : Current status and potential challenges in the face of climate change. *World Mycotoxin Journal*, 9(5), 771-789. <https://doi.org/10.3920/WMJ2016.2130>

- Bashyal, B., Li, L., Bains, T., Debnath, A., & LaBarbera, D. V. (2017). *Larrea tridentata* : A novel source for anti-parasitic agents active against *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Naegleria fowleri*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), e0005832. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005832>
- Battilani, P., Camardo Leggieri, M., Rossi, V., & Giorni, P. (2013). AFLA-maize, a mechanistic model for *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin B1 contamination in maize. *Computers and Electronics in Agriculture*, 94, 38-46. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2013.03.005>
- Bbosa, G. (2013). Aflatoxins metabolism, effects on epigenetic mechanisms and their role in carcinogenesis. *Health*, 5, 14-34. <https://doi.org/10.4236/health.2013.510A1003>
- Bbosa, G., Kitya, D., Lubega, A., Ogwal-Okeng, J., Anokbonggo, W., & Kyegombe, D. (2013). Review of the Biological and Health Effects of Aflatoxins on Body Organs and Body Systems. In *InTech: Aflatoxins-Recent Advances and Future Prospects* Vol. 3, 239-265. <https://doi.org/10.5772/51201>
- Becher, R., Hettwer, U., Karlovsky, P., Deising, H. B., & Wirsel, S. G. R. (2010). Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology*, 100(5), 444-453. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-100-5-0444>
- Bhat, R., Rai, R. V., & Karim, A. A. (2010). Mycotoxins in Food and Feed : Present Status and Future Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(1), 57-81. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2009.00094.x>
- Bhatnagar, D., Cary, J. W., Ehrlich, K., Yu, J., & Cleveland, T. E. (2006). Understanding the genetics of regulation of aflatoxin production and *Aspergillus flavus* development. *Mycopathologia*, 162(3), 155-166. <https://doi.org/10.1007/s11046-006-0050-9>
- Bibikova, M. V., Spiridonova, N. A., Korystova, A. F., Kublik, L. N., Levitman, M. K., Shaposhnikova, V. V., & Korystov, Y. N. (2017). Lipxygenase Inhibitors Nordihydroguaiaretic Acid and Fungus *Lecanicillum lecanii* Extract Induce Death of Lymphoid Leukemia Cells. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 163(3), 330-333. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3796-9>
- Birch, A. J. (1967). Biosynthesis of polyketides and related compounds. *Science*, 156(3772), 202-206. <https://doi.org/10.1126/science.156.3772.202>
- Blair, D. (1989). Uncertainties in Pesticide Risk Estimation and Consumer Concern. *Nutrition Today*, 24(6), 13-19.
- Bluma, R., Amaiden, M. R., Daghero, J., & Etcheverry, M. (2008). Control of *Aspergillus* section *Flavi* growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, 105(1), 203-214. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03741.x>
- Bok, J. W., & Keller, N. P. (2004). LaeA, a Regulator of Secondary Metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 527-535. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.527-535.2004>

- Bondy, G. S., & Pestka, J. J. (2000). Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B, Critical Reviews*, 3(2), 109-143. <https://doi.org/10.1080/109374000281113>
- Boudra, H., Barnouin, J., Dragacci, S., & Morgavi, D. P. (2007). Aflatoxin M1 and Ochratoxin A in Raw Bulk Milk from French Dairy Herds. *Journal of Dairy Science*, 90(7), 3197-3201. <https://doi.org/10.3168/jds.2006-565>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Brinker, F. (1993). *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (Chaparral or Creosote Bush). *British Journal of Phytotherapy*, 3, 13-30.
- Brown, R. L., Cotty, P. J., & Cleveland, T. E. (1991). Reduction in Aflatoxin Content of Maize by Atoxigenic Strains of *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Protection*, 54(8), 623-626. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-54.8.623>
- Buran, T. J., Sandhu, A. K., Li, Z., Rock, C. R., Yang, W. W., & Gu, L. (2014). Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins. *Journal of Food Engineering*, 128, 167-173. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.12.029>
- Cacace, J. E., & Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering*, 59(4), 379-389. [https://doi.org/10.1016/s0260-8774\(02\)00497-1](https://doi.org/10.1016/s0260-8774(02)00497-1)
- Caceres, I., Al Khoury, A., El Khoury, R., Lorber, S., P. Oswald, I., El Khoury, A., Atoui, A., Puel, O., & Bailly, J.-D. (2020). Aflatoxin Biosynthesis and Genetic Regulation: A Review. *Toxins*, 12(3), 150. <https://doi.org/10.3390/toxins12030150>
- Caceres, I., El Khoury, R., Bailly, S., Oswald, I. P., Puel, O., & Bailly, J.-D. (2017). Piperine inhibits aflatoxin B1 production in *Aspergillus flavus* by modulating fungal oxidative stress response. *Fungal Genetics and Biology*, 107, 77-85. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2017.08.005>
- Caceres, I., El Khoury, R., Medina, Á., Lippi, Y., Naylies, C., Atoui, A., El Khoury, A., Oswald, I. P., Bailly, J. D., & Puel, O. (2016). Deciphering the Anti-Aflatoxinogenic Properties of Eugenol Using a Large-Scale q-PCR Approach. *Toxins*, 8(5), 123. <https://doi.org/10.3390/toxins8050123>
- Cadena-Iñiguez, P. (2014). Tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora* (L) Willd) El arbol de la piel. *Agro Productividad*, 7(6). <https://www.revista-agroproductividad.org/index.php/agroproductividad/article/view/560>
- Celandroni, F., Vecchione, A., Cara, A., Mazzantini, D., Lupetti, A., Id, E.G., 2019. Identification of *Bacillus* species : Implication on the quality of probiotic formulations. *PLOS. ONE.*, Vol 14, 1–13

- Calvo Irabién, L. M. (2012). *Plantas aromáticas de Yucatán* (1^{re} éd., Vol. 1). Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C.
- Calvo-Irabién, L. M. (2018). Native Mexican aromatic flora and essential oils: Current research status, gaps in knowledge and agro-industrial potential. *Industrial Crops and Products*, *111*, 807-822. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.11.044>
- Camargo-Ricalde, S. (2000). Descripción, distribución, anatomía, composición química y usos de *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae) en México. *Revista de Biología Tropical*, *48*, 939-954.
- Camargo-Ricalde, S., & Grether, R. (1998). Germinación, dispersión y establecimiento de plántulas de *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae) en México. *Revista de Biología Tropical*, *46*, 543-554. <https://doi.org/10.15517/rbt.v46i3.20088>
- Carvajal, M. (2013). Transformación de la aflatoxina B1 de alimentos, en el cancerígeno humano, aducto AFB1-ADN. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, *16*(2), 109-120 Article 2. [https://doi.org/10.1016/S1405-888X\(13\)72082-5](https://doi.org/10.1016/S1405-888X(13)72082-5)
- Cary, J. W., Ehrlich, K. C., Wright, M., Chang, P. K., & Bhatnagar, D. (2000). Generation of aflR disruption mutants of *Aspergillus parasiticus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *53*(6), 680-684. <https://doi.org/10.1007/s002530000319>
- Cary, J. W., Rajasekaran, K., Brown, R. L., Luo, M., Chen, Z.-Y., & Bhatnagar, D. (2011). Developing Resistance to Aflatoxin in Maize and Cottonseed. *Toxins*, *3*(6), 678-696. <https://doi.org/10.3390/toxins3060678>
- Castañeda, G., Yúfera, E., Cohen, S., Martínez-Téllez, M., Vargas-Arispuro, I., Moya, P., & Alvarez Manilla, G. (2001). In vitro Inhibition of Mycelial Growth of *Tilletia indica* by Extracts of Native Plants from Sonora, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, *19*, 214-217.
- Castellanos-Hernández, O. A., Rodríguez-Sahagun, M., Acevedo-Hernandez, G., Aarland Rayn, C., & Rodríguez-Sahagun, A. (2020). Evaluacion Antimicrobiana del Aceite Esencial de *Lippia graveolens* como inhibidor de Crecimiento de *Salmonella* sp, E. coli y Enterococcus sp. *e-CUCBA*, *7*(14), 1-6.
- Celestin Munimbazi & Lloyd B. Bullerman, 1998. Inhibition of aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 by *Bacillus pumilus*. *Mycopathologia*, Vol. 140, 163-169
- Celhay, C. (2013). Fractionnement de coproduits de pin maritime (*Pinus pinaster*) et de peuplier (*Populus tremula*) pour l'obtention d'extraits polyphénoliques à activité antioxydante : Procédé d'extraction aqueuse en extracteur bi-vis et étude des conditions subcritiques. Thèse de doctorat, Institut National Polytechnique de Toulouse.
- Chang, P. K. (2003). The *Aspergillus parasiticus* protein AFLJ interacts with the aflatoxin pathway-specific regulator AFLR. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, *268*(6), 711-719. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0809-3>

- Chang, P. K., Abbas, H. K., Weaver, M. A., Ehrlich, K. C., Scharfenstein, L. L., & Cotty, P. J. (2012). Identification of genetic defects in the atoxigenic biocontrol strain *Aspergillus flavus* K49 reveals the presence of a competitive recombinant group in field populations. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 192-196. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.01.005>
- Chang, P. K., Horn, B. W., & Dorner, J. W. (2005). Sequence breakpoints in the aflatoxin biosynthesis gene cluster and flanking regions in nonaflatoxigenic *Aspergillus flavus* isolates. *Fungal Genetics and Biology*, 42(11), 914-923. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2005.07.004>
- Chemat, F. (2011). *Eco-extraction du végétal : Procédés innovants et solvants alternatifs*. Paris : Dunod diffusion/distribution : l'Usine nouvelle diffusion/distribution.
- Chen, Y., Kong, Q., & Liang, Y. (2019). Three newly identified peptides from *Bacillus megaterium* strongly inhibit the growth and aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*. *Food Control*, 95, 41-49. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.07.040>
- Chulze, S. N. (2010). Strategies to reduce mycotoxin levels in maize during storage : A review. *Food Additives & Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment*, 27(5), 651-657. <https://doi.org/10.1080/19440040903573032>
- Clark, D. (2003). *Treating Herpes Naturally with Larrea tridentata*. International Medical Larrea Society.
- CONABIO. (2009). *Larrea tridentata*. Zygothylaceae *Larrea tridentata* (Sessé & Moc. ex DC.) Coville Gobernadora. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/zygothylaceae/larrea-tridentata/fichas/ficha.htm>
- Cortés-Chitala, M. D. C., Flores-Martínez, H., Orozco-Ávila, I., León-Campos, C., Suárez-Jacobo, Á., Estarrón-Espinosa, M., & López-Muraira, I. (2021). Identification and Quantification of Phenolic Compounds from Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK) Hydroethanolic Extracts and Evaluation of Its Antioxidant Capacity. *Molecules*, 26 (3), 702. <https://doi.org/10.3390/molecules26030702>
- Cotty, P. (1990). Effect of atoxigenic strains of *Aspergillus flavus* on aflatoxin contamination of developing cottonseed. *Plant disease*, 74(3), 233-235. <https://doi.org/10.1094/PD-74-0233>
- Cotty, P., Antill, L., & Wakelyn, P. (2007). Competitive Exclusion of Aflatoxin Producers : Farmer-driven Research and Development. In: Vincent, C., Goettel, N., Lazarovits, G. (Eds.), *Biological Control: A Global Perspective*. CAB International, Wallingford, UK, 241–253. <https://doi.org/10.1079/9781845932657.0241>
- Cruz, M. P., Andrade, C. M. F., Silva, K. O., Souza, E. P. de, Yatsuda, R., Marques, L. M., David, J. P., David, J. M., Napimoga, M. H., & Clemente-Napimoga, J. T. (2016). Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, Fractions and Flavones

- Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). *Plos one*, 11(3), e0150839. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150839>
- Cuong, D., Xuan Hoan, N., Huu Dong, D., Thuy, L., Thanh, N., Thai Ha, H., Tuyen, D., & Chinh, D. (2019). Tannins : Extraction from Plants. In: Aires, A. (eds) *Tannins - structural properties, biological properties and current knowledge*. London, UK: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86040>
- Dai, J., & Mumper, R. J. (2010). Plant Phenolics : Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties. *Molecules*, 15(10), 7313-7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>
- Dalvi, R. R. (1986). An overview of aflatoxicosis of poultry : Its characteristics, prevention and reduction. *Veterinary Research Communications*, 10(6), 429-443. <https://doi.org/10.1007/BF02214006>
- Dayan, F. E., Cantrell, C. L., & Duke, S. O. (2009). Natural products in crop protection. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(12), 4022-4034. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.01.046>
- De Sahagún, B. (1929). *Historia general de las cosas de la Nueva España*. Cambridge University Press. 48-48. ISBN 9780511792878.
- De Albuquerque, U. P., Muniz de Medeiros, P., de Almeida, A. L. S., Monteiro, J. M., Machado de Freitas Lins Neto, E., Gomes de Melo, J., & dos Santos, J. P. (2007). Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil : A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 114(3), 325-354. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.08.017>
- Del Vecchio-Tenorio, G., Rodríguez-Cruz, M., Andrade-Cetto, A., & Cárdenas-Vázquez, R. (2016). Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Improves Insulin Sensitivity and Reduces Plasma and Hepatic Lipids in Hamsters Fed a High Fat and Cholesterol Diet. *Frontiers in Pharmacology*, 7, 194. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00194>
- Depuydt, S., Praet, S., Nelissen, H., Vanholme, B., & Vereecke, D. (2016). How Plant Hormones and Their Interactions Affect Cell Growth. In: Rose, R.J. (Eds.), *Molecular cell biology of the growth and differentiation of plant cells*, 174–195. USA: CRC Press. <https://doi.org/10.1201/b20316-14>
- Dharumadurai, D., Shanmugapriya, S., Thajuddin, N., & Annamalai, P. (2011). Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals. In: Guevara-Gonzalez, R. G. (Eds.) *Aflatoxins - Biochemistry and Molecular Biology*. London: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/22717>
- Di Natale, F., Gallo, M., & Nigro, R. (2009). Adsorbents selection for aflatoxins removal in bovine milks. *Journal of Food Engineering*, 95(1), 186-191. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.023>

- Diao, E., Dong, H., Hou, H., Zhang, Z., Ji, N., & Ma, W. (2014). Factors Influencing Aflatoxin Contamination in Before and After Harvest Peanuts : A Review. *Journal of Food Research*, 4, 148-154. <https://doi.org/10.5539/jfr.v4n1p148>
- Dominguez, X. A., Garcia, S., Williams, H. J., Ortiz, C., Scott, A. I., & Reibenspies, J. H. (1989). Kukulkanins A and B, new chalcones from *Mimosa tenuiflora*. *Journal of Natural Products*, 52(4), 864-867. <https://doi.org/10.1021/np50064a035>
- Dorner, J. W. (2009). Development of Biocontrol Technology to Manage Aflatoxin Contamination in Peanuts. *Peanut Science*, 36(1), 60-67. <https://doi.org/10.3146/AT07-002.1>
- Dorner, J. W., & Lamb, M. C. (2006). Development and commercial use of afla-Guard(®), an aflatoxin biocontrol agent. *Mycotoxin research*, 22, 33-38. <https://doi.org/10.1007/BF02954555>
- Du, W., Obrian, G. R., & Payne, G. A. (2007). Function and regulation of aflJ in the accumulation of aflatoxin early pathway intermediate in *Aspergillus flavus*. *Food Additives and Contaminants*, 24(10), 1043-1050. <https://doi.org/10.1080/02652030701513826>
- Dugyala, R. R., & Sharma, R. P. (1996). The effect of aflatoxin B1 on cytokine mRNA and corresponding protein levels in peritoneal macrophages and splenic lymphocytes. *International Journal of Immunopharmacology*, 18(10), 599-608. [https://doi.org/10.1016/s0192-0561\(96\)00066-5](https://doi.org/10.1016/s0192-0561(96)00066-5)
- Dutton, M. F. (1988). Enzymes and aflatoxin biosynthesis. *Microbiological Reviews*, 52(2), 274-295. <https://doi.org/10.1128/mr.52.2.274-295.1988>
- EFSA, (European Food Safety Authority). (2007). Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *The EFSA Journal*, 446, 1-127.
- Ehrlich, K. C. (2009). Predicted Roles of the Uncharacterized Clustered Genes in Aflatoxin Biosynthesis. *Toxins*, 1(1), 37-58. <https://doi.org/10.3390/toxins1010037>
- Ehrlich, K. C. (2014). Non-aflatoxigenic *Aspergillus flavus* to prevent aflatoxin contamination in crops : Advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, 50. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00050>
- El Khoury, R., Caceres, I., Puel, O., Bailly, S., Atoui, A., Oswald, I. P., El Khoury, A., & Bailly, J.-D. (2017). Identification of the Anti-Aflatoxinogenic Activity of *Micromeria graeca* and Elucidation of Its Molecular Mechanism in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 9(3), 87. <https://doi.org/10.3390/toxins9030087>
- El Mahgubi, A., Puel, O., Bailly, S., Tadrast, S., Querin, A., Ouadia, A., Oswald, I. P., & Bailly, J. D. (2013). Distribution and Toxigenicity of *Aspergillus Section Flavi* in Spices Marketed in Morocco. *Food Control*, 32(1), 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.013>

- El-Desouky, T. A. (2021). Evaluation of effectiveness aqueous extract for some leaves of wild edible plants in Egypt as anti-fungal and anti-toxigenic. *Heliyon*, 7(2), e06209. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06209>
- Ellis, W. O., Smith, J. P., Simpson, B. K., & Oldham, J. H. (1991). Aflatoxins in food : Occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 30(4), 403-439. <https://doi.org/10.1080/10408399109527551>
- EL-Nagerabi, P. S., Elshafie, A., AlKhanjari, S., Al-Bahry, S., & Elamin, M. (2013). Biological activities of *Boswellia sacra* extracts on the growth and aflatoxins secretion of two aflatoxigenic species of *Aspergillus* species. *Food Control*, 34, 763-769. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.039>
- El-Nahla, S. M., Imam, H. M., Ibrahim, A. M., & Ghanam, A. R. (2013). Teratogenic effects of aflatoxin in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of veterinary anatomy, J Vet Anat*, 6(2), 67-85. <https://doi.org/10.21608/jva.2013.45024>
- Elzupir, A. O., Abas, A. R. A., Fadul, M. H., Modwi, A. K., Ali, N. M. I., Jadian, A. F. F., Ahmed, N. A. A., Adam, S. Y. A., Ahmed, N. A. M., Khairy, A. A. A., & Khalil, E. A. G. (2012). Aflatoxin M₁ in breast milk of nursing Sudanese mothers. *Mycotoxin Research*, 28(2), 131-134. <https://doi.org/10.1007/s12550-012-0127-x>
- Escribano-Bailon, M., & Santos-Buelga. (2003). Polyphenol extraction from foods. In: Santos-Buelga, C. (eds) *Methods in Polyphenol Analysis* 1-12. London, Royal Society of Chemistry.
- FAO. (2004). *Worldwide regulations for mycotoxins in food and feed in 2003, Rome, Italy*. <http://www.fao.org/3/y5499e/y5499e00.htm>
- FAO/WHO. (1999). *Evaluation of certain food additives and contaminants*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42142>
- Felix D'Mello, J. P., Macdonald, A. M. C., Postel, D., Dijksma, W. T. P., Dujardin, A., & Placinta, C. M. (1998). Pesticide Use and Mycotoxin Production in *Fusarium* and *Aspergillus* Phytopathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 104(8), 741-751. <https://doi.org/10.1023/A:1008621505708>
- Ferreira, F. D., Kimmelmeier, C., Arrotéia, C. C., da Costa, C. L., Mallmann, C. A., Janeiro, V., Ferreira, F. M. D., Mossini, S. A. G., Silva, E. L., & Machinski, M. (2013). Inhibitory effect of the essential oil of *Curcuma longa* L. and curcumin on aflatoxin production by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, 136(2), 789-793. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.08.003>
- Flaherty, J. E., & Payne, G. A. (1997). Overexpression of aflR Leads to Upregulation of Pathway Gene Transcription and Increased Aflatoxin Production in *Aspergillus flavus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(10), 3995-4000. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.10.3995-4000.1997>

- Fountain, J. C., Bajaj, P., Pandey, M., Nayak, S. N., Yang, L., Kumar, V., Jayale, A. S., Chitikineni, A., Zhuang, W., Scully, B. T., Lee, R. D., Kemerait, R. C., Varshney, R. K., & Guo, B. (2016). Oxidative stress and carbon metabolism influence *Aspergillus flavus* transcriptome composition and secondary metabolite production. *Scientific Reports*, 6, 38747. <https://doi.org/10.1038/srep38747>
- Friedman, M., & Rasooly, R. (2013). Review of the inhibition of biological activities of food-related selected toxins by natural compounds. *Toxins*, 5(4), 743-775. <https://doi.org/10.3390/toxins5040743>
- Frisvad, J. C., Hubka, V., Ezekiel, C. N., Hong, S.-B., Nováková, A., Chen, A. J., Arzanlou, M., Larsen, T. O., Sklenář, F., Mahakarnchanakul, W., Samson, R. A., & Houburken, J. (2019). Taxonomy of *Aspergillus* section *Flavi* and their production of aflatoxins, ochratoxins and other mycotoxins. *Studies in Mycology*, 93, 1-63. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.06.001>
- Fung, F., & Clark, R. F. (2004). Health Effects of Mycotoxins : A Toxicological Overview. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 42(2), 217-234. <https://doi.org/10.1081/CLT-120030947>
- Gallo, A., Solfrizzo, M., Epifani, F., Panzarini, G., & Perrone, G. (2016). Effect of temperature and water activity on gene expression and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus* on almond medium. *International Journal of Food Microbiology*, 217, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.10.026>
- Garcia, B. (2012). *Larrea tridentata* (Sessé y Mo. Ex DC.) Coville. Thèse de doctorat, Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro.
- García-Díaz, M., Gil-Serna, J., Patiño, B., García-Cela, E., Magan, N., & Medina, Á. (2020). Assessment of the Effect of *Satureja montana* and *Origanum virens* Essential Oils on *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Production at Different Water Activities. *Toxins*, 12(3), 142. <https://doi.org/10.3390/toxins12030142>
- García-Díaz, M., Patiño, B., Vázquez, C., & Gil-Serna, J. (2019). A Novel Niosome-Encapsulated Essential Oil Formulation to Prevent *Aspergillus flavus* Growth and Aflatoxin Contamination of Maize Grains During Storage. *Toxins*, 11(11), 646. <https://doi.org/10.3390/toxins11110646>
- Georgianna, D. R., & Payne, G. A. (2009). Genetic regulation of aflatoxin biosynthesis: From gene to genome. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 46(2), 113-125. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.10.011>
- Gessler, N. N., Aver'yanov, A. A., & Belozerskaya, T. A. (2007). Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistr*, 72(10), 1091-1109. <https://doi.org/10.1134/s0006297907100070>
- Ghanbari, R., Molaee, E., Noorbakhsh, F., Jahed, G., Mahmoud, K., Soleimani, M., 2017. The inhibitory effect of lactic acid bacteria on aflatoxin production and expression of *aflR* gene in *Aspergillus parasiticus*. *J. Food. Saf.*, Vol. 38, 2–7. doi:10.1111/jfs.12413

- Ghosh, R. C., Chauhan, H. V., & Jha, G. J. (1991). Suppression of cell-mediated immunity by purified aflatoxin B1 in broiler chicks. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 28(2), 165-172. [https://doi.org/10.1016/0165-2427\(91\)90138-3](https://doi.org/10.1016/0165-2427(91)90138-3)
- Gieseke, K. E. (2004). Outbreak of Aflatoxin Poisoning-Eastern and Central Provinces, Kenya, January-July 2004. *Morbidity and mortality weekly report*, 53(34), 790-3 https://scholarworks.gsu.edu/iph_facpub/3
- Gnabre, J., Bates, R., & Huang, R. C. (2015). Creosote bush lignans for human disease treatment and prevention: Perspectives on combination therapy. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5(3), 119-126. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2014.11.024>
- Gnabre, J. N., Brady, J. N., Clanton, D. J., Ito, Y., Dittmer, J., Bates, R. B., & Huang, R. C. (1995). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription and replication by DNA sequence-selective plant lignans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(24), 11239-11243. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.24.11239>
- Gnonlonfin, G. J. B., Adjovi, Y., Gbaguidi, F., Gbenou, J., Katerere, D., Brimer, L., & Sanni, A. (2011). Scopoletin in Cassava Products as an Inhibitor of Aflatoxin Production. *Journal of Food Safety*, 31(4), 553-558. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2011.00334.x>
- Gonzalez, M., soto-hernandez, M., Kite, G., & Martinez-Vazquez, M. (2007). Antioxidant activity of flavonoids from the stem of the Mexican Oregano (*Lippia graveolens* HBK var. *Berlandieri* Schauer). *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30, 43-49.
- Gorran, A., Farzaneh, M., Shivazad, M., Rezaeian, M., & Ghassempour, A. (2013). Aflatoxin B1-reduction of *Aspergillus flavus* by three medicinal plants (*Lamiaceae*). *Food Control*, 31(1), 218-223. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.024>
- Granados-Sánchez, D., Martínez-Salvador, M., López-Ríos, G. F., Borja-De la Rosa, A., & Rodríguez-Yam, G. A. (2013). Ecología, aprovechamiento y comercialización del orégano (*Lippia graveolens* H. B. K.) en Mapimí, Durango. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 19(2), 305-321. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2012.05.035>
- Gutiérrez, A., del Río, J., González-Vila, F. J., & Martín, F. (1999). Chemical Composition of Lipophilic Extractives from *Eucalyptus globulus* Labill. Wood. *Holzforschung*, 53, 481-486. <https://doi.org/10.1515/HF.1999.079>
- Hage, D. S. (2018). Chromatography. In Rifai N., Horvath A., Wittwer C. T, Hoofnagle A. (eds) *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry*, 1-32. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816063-3.00001-3>
- Hamid, A. S., Tesfamariam, I. G., Zhang, Y., & Zhang, Z. G. (2013). Aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinoma in developing countries: Geographical distribution, mechanism of action and prevention. *Oncology Letters*, 5(4), 1087-1092. <https://doi.org/10.3892/ol.2013.1169>

- Hartnoll, G., Moore, D., & Douek, D. (1993). Near fatal ingestion of oil of cloves. *Archives of Disease in Childhood*, 69(3), 392-393. <https://doi.org/10.1136/adc.69.3.392>
- Hasan, H. A. H. (1999). Mode of action of pesticides on aflatoxin biosynthesis and oxidase system activity. *Microbiological Research*, 154(1), 95-102. [https://doi.org/10.1016/S0944-5013\(99\)80041-X](https://doi.org/10.1016/S0944-5013(99)80041-X)
- Heinrich, M., Kuhnt, M., Wright, C. W., Rimpler, H., Phillipson, J. D., Schandelmaier, A., & Warhurst, D. C. (1992). Parasitological and microbiological evaluation of Mixe Indian medicinal plants (Mexico). *Journal of Ethnopharmacology*, 36(1), 81-85. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90063-w](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90063-w)
- Hell, K., & Mutegi, C. (2011). Aflatoxin control and prevention strategies in key crops of Sub-Saharan Africa. *African Journal of Microbiology Research*, 5, 459-466.
- Henning, S. M., Zhang, Y., Seeram, N. P., Lee, R.-P., Wang, P., Bowerman, S., & Heber, D. (2011). Antioxidant capacity and phytochemical content of herbs and spices in dry, fresh and blended herb paste form. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62(3), 219-225. <https://doi.org/10.3109/09637486.2010.530595>
- Hernandez, T., García, A., Javier, C., Avila, J., Margarita, C., Lira, R., & Samuel, M. (2009). Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(4), 295-300.
- Hernández-Baez, I., García-López, J. C., Espinosa-Reyes, G., Lee-Rangel, H. A., & Faz-Colunga, D. Á. (2019). Creosote bush (*Larrea tridentata*) biomass as fodder for sheep. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 18(2), 1-9.
- Hong, S.-Y., Roze, L. V., & Linz, J. E. (2013). Oxidative Stress-Related Transcription Factors in the Regulation of Secondary Metabolism. *Toxins*, 5(4), 683-702. <https://doi.org/10.3390/toxins5040683>
- Hong, S.-Y., Roze, L. V., Wee, J., & Linz, J. E. (2013). Evidence that a transcription factor regulatory network coordinates oxidative stress response and secondary metabolism in aspergilli. *MicrobiologyOpen*, 2(1), 144-160. <https://doi.org/10.1002/mbo3.63>
- Hussein, H. S., & Brasel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167(2), 101-134. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(01\)00471-1](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(01)00471-1)
- IARC. (2012). Fungi producing significant mycotoxins. *IARC Scientific Publications*, 158, 1-30.
- IARC. (2002). Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*, 82, 1-556. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326619/>

- Ibe, O. C. (2013). Diffusion Processes. In Ibe O. C. (Éd), *Markov Processes for Stochastic Modeling (Second Edition)* p. 295-327. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407795-9.00010-4>
- Ismail, A., Gonçalves, B. L., de Neeff, D. V., Ponzilacqua, B., Coppa, C. F. S. C., Hintzsche, H., Sajid, M., Cruz, A. G., Corassin, C. H., & Oliveira, C. A. F. (2018). Aflatoxin in foodstuffs : Occurrence and recent advances in decontamination. *Food Research International*, 113, 74-85. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.067>
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, 19(8), 603-608. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(00\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(00)00079-X)
- Isman, M., & Machial, C. M. (2006). Pesticides based on plant essential oils : From traditional practice to commercialization. *Naturally Occurring Bioactive Compounds*, 3, 29-44.
- Jahanshiri, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., Allameh, A., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2012). Effect of Curcumin on *Aspergillus parasiticus* Growth and Expression of Major Genes Involved in the Early and Late Stages of Aflatoxin Biosynthesis. *Iran J Public Health*, 41(6), 72-79.
- Jalili, M. (2016). A Review on Aflatoxins Reduction in Food. *Iranian Journal of Health, Safety and Environment*, 3(1), 445-459.
- Jeff-Agboola, Y. A., & Awe, L. B. (2016). Antifungal and phytochemical screening of some Nigerian medicinal plant extracts against toxigenic *Aspergillus flavus*. *Cogent Food & Agriculture*, 2(1), 1210556. <https://doi.org/10.1080/23311932.2016.1210556>
- Jermnak, U., Yoshinari, T., Sugiyama, Y., Tsuyuki, R., Nagasawa, H., & Sakuda, S. (2012). Isolation of methyl syringate as a specific aflatoxin production inhibitor from the essential oil of *Betula alba* and aflatoxin production inhibitory activities of its related compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 339-344. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.023>
- Jiang, Y., Jolly, P. E., Ellis, W. O., Wang, J.-S., Phillips, T. D., & Williams, J. H. (2005). Aflatoxin B1 albumin adduct levels and cellular immune status in Ghanaians. *International Immunology*, 17(6), 807-814. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh262>
- Jiang, Y., Jolly, P. E., Preko, P., Wang, J.-S., Ellis, W. O., Phillips, T. D., & Williams, J. H. (2008). Aflatoxin-related immune dysfunction in health and in human immunodeficiency virus disease. *Clinical & Developmental Immunology*, 2008, 1-12. <https://doi.org/10.1155/2008/790309>
- Johnson, W. W., Ueng, Y. F., Widersten, M., Mannervik, B., Hayes, J. D., Sherratt, P. J., Ketterer, B., & Guengerich, F. P. (1997). Conjugation of highly reactive aflatoxin B1 exo-8,9-epoxide catalyzed by rat and human glutathione transferases : Estimation of kinetic parameters. *Biochemistry*, 36(11), 3056-3060. <https://doi.org/10.1021/bi962537o>

- Juan, C., Zinedine, A., Moltó, J. C., Idrissi, L., & Mañes, J. (2008). Aflatoxins levels in dried fruits and nuts from Rabat-Salé area, Morocco. *Food Control*, 19(9), 849-853. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.010>
- Kabak, B., Dobson, A. D. W., & Var, I. (2006). Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed : A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46(8), 593-619. <https://doi.org/10.1080/10408390500436185>
- Kedia, A., Prakash, B., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2014). Antifungal and antiaflatoxicogenic properties of *Cuminum cyminum* (L.) seed essential oil and its efficacy as a preservative in stored commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 168-169, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.008>
- Keenan, J., Jolly, P., Preko, P., Baidoo, J., Wang, J., Phillips, T., Williams, J., & Jr, G. (2011). Association between aflatoxin B1 albumin adduct levels and tuberculosis infection among HIV+ Ghanaians. *Archives of Clinical Microbiology*, 2(3), 3.
- Khan, T., Shahid, A. A., & Khan, H. A. A. (2016). Could biorational insecticides be used in the management of aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus* and its insect vectors in stored wheat? *PeerJ*, 4, e1665. <https://doi.org/10.7717/peerj.1665>
- Kim, J., Choi, K., & Chung, D. S. (2012). Sample Preparation for Capillary Electrophoretic Applications. In J. Pawliszyn (Éd.), *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 701-721. Academic Press Oxford, UK. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00110-1>
- Kim, J. H., Campbell, B. C., Molyneux, R., Mahoney, N., Chan, K. L., Yu, J., Wilkinson, J., Cary, J., Bhatnagar, D., & Cleveland, T. E. (2006). Gene targets for fungal and mycotoxin control. *Mycotoxin Research*, 22(1), 3-8. <https://doi.org/10.1007/BF02954550>
- Kim, J. H., Yu, J., Mahoney, N., Chan, K. L., Molyneux, R. J., Varga, J., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Nierman, W. C., & Campbell, B. C. (2008). Elucidation of the functional genomics of antioxidant-based inhibition of aflatoxin biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1), 49-60. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.058>
- Klich, M. A. (2007). *Aspergillus flavus* : The major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*, 8(6), 713-722. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2007.00436.x>
- Kong, Q., Chi, C., Yu, J., Shan, S., Li, Q., Li, Q., Guan, B., Nierman, W. C., & Bennett, J. W. (2014). The inhibitory effect of *Bacillus megaterium* on aflatoxin and cyclopiazonic acid biosynthetic pathway gene expression in *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(11), 5161-5172. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5632-8>
- Konno, C., Lu, Z.-Z., Xue, H.-Z., Erdelmeier, C. A. J., Meksuriyen, D., Che, C.-T., Cordell, G. A., Soejarto, D. D., Waller, D. P., & Fong, H. H. S. (1990). Furanoid Lignans from *Larrea tridentata*. *Journal of Natural Products*, 53(2), 396-406. <https://doi.org/10.1021/np50068a019>

- Konno, C., Xue, H.-Z., Lu, Z.-Z., Ma, B.-X., Erdelmeier, C. A. J., Che, C.-T., Cordell, G. A., Soejarto, D. D., Waller, D. P., & Fong, H. H. S. (1989). 1-Aryl Tetralin Lignans from *Larrea tridentata*. *Journal of Natural Products*, 52(5), 1113-1117. <https://doi.org/10.1021/np50065a031>
- Kumar, A., Shukla, R., Singh, P., & Dubey, N. K. (2010). Chemical composition, antifungal and antiaflatoxigenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil and its safety assessment as plant based antimicrobial. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 48(2), 539-543. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.028>
- Kumar, V. (2018). Aflatoxins : Properties, Toxicity and Detoxification. *Nutrition & Food Science International Journal*, 6, 555696. <https://doi.org/10.19080/NFSIJ.2018.06.555696>
- Lavkor, I., Arioğlu, H., Var, I., & Oztemiz, S. (2019). Biological Control of Aflatoxigenic Fungi on Peanut for the Pre-Harvest Approach. *Turkish Journal of Field Crops*, 24, 21-27. <https://doi.org/10.17557/tjfc.562634>
- Lee, S.-E., Mahoney, N., & Campbell, B. C. (2002). Inhibition of aflatoxin B1 biosynthesis by piperlongumine isolated from *Piper longum* L. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 12, 679-682.
- León, L., Maldonado, E., Cruz, A., & Ortega, A. (2004). Tenuiflorins A-C: New 2-phenoxychromones from the leaves of *Mimosa tenuiflora*. *Planta Medica*, 70(6), 536-539. <https://doi.org/10.1055/s-2004-827154>
- Lewis, L., Onsongo, M., Njapau, H., Schurz-Rogers, H., Lubber, G., Kieszak, S., Nyamongo, J., Backer, L., Dahiye, A. M., Misore, A., DeCock, K., & Rubin, C. (2005). Aflatoxin Contamination of Commercial Maize Products during an Outbreak of Acute Aflatoxicosis in Eastern and Central Kenya. *Environmental Health Perspectives*, 113(12), 1763-1767. <https://doi.org/10.1289/ehp.7998>
- Li, D., Cao, Y., He, L., Wang, N. J., & Gu, J. R. (1993). Aberrations of p53 gene in human hepatocellular carcinoma from China. *Carcinogenesis*, 14(2), 169-173. <https://doi.org/10.1093/carcin/14.2.169>
- Li, J., & Liu, M. (2019). The Carcinogenicity of Aflatoxin B1. In Long, X. (ed), *Aflatoxin B1 Occurrence, Detection and Toxicological Effects*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.88353>
- Liang, D., Xing, F., Selvaraj, J. N., Liu, X., Wang, L., Hua, H., Zhou, L., Zhao, Y., Wang, Y., & Liu, Y. (2015). Inhibitory Effect of Cinnamaldehyde, Citral, and Eugenol on Aflatoxin Biosynthetic Gene Expression and Aflatoxin B1 Biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Journal of Food Science*, 80(12), M2917-2924. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13144>
- Lin, L.-Z., Mukhopadhyay, S., Robbins, R. J., & Harnly, J. M. (2007). Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis: An Official Publication*

- of the United Nations University, International Network of Food Data Systems*, 20(5), 361-369. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2006.09.005>
- Lira-Saldívar, R. H. L. (2003). Estado Actual del Conocimiento sobre las Propiedades Biocidas de la Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 214-222.
- Liu, J., Sun, L., Zhang, N., Zhang, J., Guo, J., Li, C., Rajput, S. A., & Qi, D. (2016). Effects of Nutrients in Substrates of Different Grains on Aflatoxin B1 Production by *Aspergillus flavus*. *BioMed Research International*, 2016, 7232858. <https://doi.org/10.1155/2016/7232858>
- Liu, Y., & Wu, F. (2010). Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: A risk assessment. *Environmental Health Perspectives*, 118(6), 818-824. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901388>
- Loi, M., Paciolla, C., Logrieco, A. F., & Mulè, G. (2020). Plant Bioactive Compounds in Pre- and Postharvest Management for Aflatoxins Reduction. *Frontiers in Microbiology*, 11, 243. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00243>
- Lozoya, X., Navarro, V., Arnason, J. T., & Kourany, E. (1989). Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (willd.) poir. (Tepescohuite) I. Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. *Archivos De Investigacion Medica*, 20(1), 87-93.
- Luo, Y., Liu, X., & Li, J. (2018). Updating techniques on controlling mycotoxins—A review. *Food Control*, 89, 123-132. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.016>
- Luque de Castro, M. D., & García Ayuso, L. E. (2000). Environmental applications | Soxhlet Extraction. In I. D. Wilson (Éd.), *Encyclopedia of Separation Science*, 2701-2709. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226770-2/06681-3>
- Macé, K., Aguilar, F., Wang, J. S., Vautravers, P., Gómez-Lechón, M., Gonzalez, F. J., Groopman, J., Harris, C. C., & Pfeifer, A. M. (1997). Aflatoxin B1-induced DNA adduct formation and p53 mutations in CYP450-expressing human liver cell lines. *Carcinogenesis*, 18(7), 1291-1297. <https://doi.org/10.1093/carcin/18.7.1291>
- MacPherson, S., Larochelle, M., & Turcotte, B. (2006). A fungal family of transcriptional regulators : The zinc cluster proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 70(3), 583-604. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00015-06>
- Mahato, D. K., Lee, K. E., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K. N., Kumar, P., & Kang, S. G. (2019). Aflatoxins in Food and Feed : An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2266. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02266>
- Mahgubi, A., Puel, O., Bailly, S., Tadriss, S., Querin, A., Abdelouahab, O., Oswald, I., & Bailly, J. (2013). Distribution and toxigenicity of *Aspergillus* section *Flavi* in spices marketed in Morocco. *Food Control*, 32, 143-148. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.013>

- Mahoney, N., & Molyneux, R. J. (2004). Phytochemical inhibition of aflatoxicity in *Aspergillus flavus* by constituents of walnut (*Juglans regia*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(7), 1882-1889. <https://doi.org/10.1021/jf030812p>
- Mannaa, M., Oh, J.Y., Kim, K.D., 2017. Microbe-mediated control of *Aspergillus flavus* in stored rice grains with a focus on aflatoxin inhibition and biodegradation. *Ann. Appl. Biol.*, Vol. 171, 1–17. doi:10.1111/aab.12381
- Marcel, S., Igor, O., Ximene, A., Sabrina, Z., De Araujo, S., Shan, A., Camargo, E., Antonio, E. G., Araujo, B., & Charles, S. (2016). Anti-inflammatory and antioxidant activities of the hydroethanol extract and fractions of the bark of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 10, 823-831. <https://doi.org/10.5897/AJPP2016.4648>
- Martel-Estrada, S. A., Olivas-Armendáriz, I., Santos-Rodríguez, E., Martínez-Pérez, C. A., García-Casillas, P. E., Hernández-Paz, J., Rodríguez-González, C. A., & Chapa-González, C. (2014). Evaluation of in vitro bioactivity of Chitosan/*Mimosa tenuiflora* composites. *Materials Letters*, 119, 146-149. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2014.01.004>
- Martel-Estrada, S.-A. (2014, avril 3). *Mimosa tenuiflora*: Redefinición de concepto durante el ciclo de vida de producto. *Academia Journals*, 6, 2014.
- Martinez-Miranda, M. M., Rosero-Moreano, M., & Taborda-Ocampo, G. (2019). Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice. *Food Control*, 98, 359-366. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.11.046>
- Massomo, S. M. S. (2020). *Aspergillus flavus* and aflatoxin contamination in the maize value chain and what needs to be done in Tanzania. *Scientific African*, 10, e00606. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2020.e00606>
- Mbacke Dieng, S. I., Mathieu, C., Sarr, A., Diatta-Badji, K., & Fall, A. D. (2020). Condensed Tannins Content and their Influence on the Antioxidant Activity of Bark Hydroethanol Extract of *Piliostigma reticulatum* (Dc) Hochst and its Fractions. *Pharmacognosy Journal*, 12(2), 361-368. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.57>
- Meckes-Lozoya, M., Lozoya, X., & González, J. L. (1990). Pharmacological properties in vitro of various extracts of *Mimosa tenuiflora* (tepescohuite). *Archivos De Investigacion Medica*, 21(2), 163-169.
- Medeiros, J. (2011). *Mimosa tenuiflora*. https://fr.wikipedia.org/w/index.php?title=Mimosa_tenuiflora&oldid=177894234
- Medina, A., Rodriguez, A., & Magan, N. (2014). Effect of climate change on *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production. *Frontiers in Microbiology*, 5, 348. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00348>
- Meira, C. C., Novaes, C. G., Novais, F. C., De Jesus, V. da S., De Oliveira, D. M., & Aguiar, R. M. (2020). Application of principal component analysis for the evaluation of the chemical constituents of *Mimosa tenuiflora* methanolic extract by DLLME/GC-MS.

- Microchemical Journal*, 152, 104284.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104284>
- Minto, R. E., & Townsend, C. A. (1997). Enzymology and Molecular Biology of Aflatoxin Biosynthesis. *Chemical Reviews*, 97(7), 2537-2556.
<https://doi.org/10.1021/cr960032y>
- Mithöfer, A., & Maffei, M. (2016). General Mechanisms of Plant Defense and Plant Toxins. In Gopalakrishnakone P., Carlini C., Ligabue-Braun R. (eds), *Plant Toxins*, 1-22. Springer. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6728-7_21-1
- Mohsenzadeh, M., Hedayati, N., Riahi-Zanjani, B., & Karimi, G. (2016). Immunosuppression following dietary aflatoxin B1 exposure : A review of the existing evidence. *Toxin Reviews*, 35, 1-7. <https://doi.org/10.1080/15569543.2016.1209523>
- Montibus, M., Pinson-Gadais, L., Richard-Forget, F., Barreau, C., & Ponts, N. (2015). Coupling of transcriptional response to oxidative stress and secondary metabolism regulation in filamentous fungi. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(3), 295-308. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.829416>
- Moral, J., Garcia-Lopez, M. T., Camiletti, B. X., Jaime, R., Michailides, T. J., Bandyopadhyay, R., & Ortega-Beltran, A. (2020). Present Status and Perspective on the Future Use of Aflatoxin Biocontrol Products. *Agronomy*, 10(4), 491. <https://doi.org/10.3390/agronomy10040491>
- Morales Medina, J. A. (2004). Estudio farmacologico de los extractos etanolicos, hexanico, cloroformico, acetato de etilo y acuoso de las hojas de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) como diuretico (Fase II). Thèse de doctorat, Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Morán-Santibañez, K., Vasquez, A. H., Varela-Ramirez, A., Henderson, V., Sweeney, J., Odero-Marah, V., Fenelon, K., & Skouta, R. (2019). *Larrea tridentata* Extract Mitigates Oxidative Stress-Induced Cytotoxicity in Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. *Antioxidants*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/antiox8100427>
- Morata, A., González, C., Tesfaye, W., Loira, I., & Suárez-Lepe, J. A. (2019). Chapter 3 - Maceration and Fermentation : New Technologies to Increase Extraction. In A. Morata (Éd.), *Red Wine Technology*, 35-49. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00003-7>
- Moreno Zuccolotto, J. A. (2010). Evaluacion Antifungica in vitro de extracto etanolic y de una fraccion polifenolica de *Lippia graveolens* sobre *Penicillium* sp. Thèse de doctorat, Universidad Autonoma Agraria Antonio Narro.
- Muñoz-Acevedo, A., Méndez, L. Y. V., Stashenko, E. E., & Kouznetsov, V. V. (2011). Improved Trolox® Equivalent Antioxidant Capacity Assay for Efficient and Fast Search of New Antioxidant Agents. *Analytical Chemistry Letters*, 1(1), 86-102. <https://doi.org/10.1080/22297928.2011.10648207>
- Muñoz-Miranda, L. A., Rodríguez-Sahagún, A., Acevedo Hernández, G. J., Cruz-Martínez, V. O., Torres-Morán, M. I., Lépiz-Ildefonso, R., Aarland, R. C., & Castellanos-Hernández,

- O. A. (2019). Evaluation of Somaclonal and Ethyl Methane Sulfonate-Induced Genetic Variation of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* H.B.K.). *Agronomy*, 9(4), 166. <https://doi.org/10.3390/agronomy9040166>
- Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C., & Bryant, C. M. (2006). Food Mycotoxins : An Update. *Journal of Food Science*, 71(5), 51-65. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2006.00052.x>
- Nafiu, M. O., Hamid, A. A., Muritala, H. F., & Adeyemi, S. B. (2017). Preparation, Standardization, and Quality Control of Medicinal Plants in Africa. In V. Kuete (Éd.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, 171-204. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00007-8>
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M., & Ueno, Y. (1997). Survey of aflatoxin B1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology*, 9(2), 77-83. <https://doi.org/10.1080/09540109709354938>
- Nelson, D. R. (2011). Progress in tracing the evolutionary paths of cytochrome P450. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1814(1), 14-18. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.08.008>
- Nesbitt, B. F., O'Kelly, J., Sargeant, K., & Sheridan, A. (1962). *Aspergillus Flavus* and Turkey X Disease : Toxic Metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature*, 195(4846), 1062-1063. <https://doi.org/10.1038/1951062a0>
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770-803. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b01285>
- Ngindu, A., Johnson, B. K., Kenya, P. R., Ngira, J. A., Ocheng, D. M., Nandwa, H., Omondi, T. N., Jansen, A. J., Ngare, W., Kaviti, J. N., Gatei, D., & Siongok, T. A. (1982). Outbreak of acute hepatitis caused by aflatoxin poisoning in Kenya. *Lancet*, 1(8285), 1346-1348. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(82\)92411-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(82)92411-4)
- Nobili, C., De Acutis, A., Reverberi, M., Bello, C., Leone, G. P., Palumbo, D., Natella, F., Procacci, S., Zjalic, S., & Brunori, A. (2019). Buckwheat Hull Extracts Inhibit *Aspergillus flavus* Growth and AFB1 Biosynthesis. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1997. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01997>
- Oberemok, V. V., Zaitsev, A. S., Levchenko, N. N., & Nyadar, P. M. (2015). A brief review of most widely used modern insecticides and prospects for the creation of DNA insecticides. *Entomological Review*, 95(7), 824-831. <https://doi.org/10.1134/S0013873815070027>
- OBrian, G. R., Georgianna, D. R., Wilkinson, J. R., Yu, J., Abbas, H. K., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Nierman, W., & Payne, G. A. (2007). The effect of elevated temperature on gene transcription and aflatoxin biosynthesis. *Mycologia*, 99(2), 232-239. <https://doi.org/10.1080/15572536.2007.11832583>

- Ochiai, N., Tokai, T., Takahashi-Ando, N., Fujimura, M., & Kimura, M. (2007). Genetically engineered *Fusarium* as a tool to evaluate the effects of environmental factors on initiation of trichothecene biosynthesis. *FEMS Microbiology Letters*, 275(1), 53-61. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00869.x>
- Odhiambo, B. (2014). Screening for Atoxigenic *Aspergillus* Species and Evaluating their Inhibitory Potential against Growth and Sporulation of Aflatoxigenic *Aspergillus* Species. *Egerton Journal of Science and Technology*, 14, 61-80.
- Olarte, R. A., Horn, B. W., Dorner, J. W., Monacell, J. T., Singh, R., Stone, E. A., & Carbone, I. (2012). Effect of sexual recombination on population diversity in aflatoxin production by *Aspergillus flavus* and evidence for cryptic heterokaryosis. *Molecular Ecology*, 21(6), 1453-1476. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05398.x>
- Oliveira, C., Rosmaninho, J., Butkeraitis, P., Correa, B., Reis, T., Guerra, J., Albuquerque, R., & Moro, M. (2002). Effect of low levels of dietary aflatoxin B1 on laying japanese quail. *Poultry Science*, 81(7), 976-980. <https://doi.org/10.1093/ps/81.7.976>
- Oliveira, E. de, Vital, B. R., Pimenta, A. S., Della Lucia, R. M., Ladeira, A. M. M., & Carneiro, A. de C. O. (2006). Estrutura anatômica da madeira e qualidade do carvão de *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. *Revista Árvore*, 30, 311-318. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622006000200018>
- Olugbenga, O., Adejumo, T., & Orole, R. (2016). Antifungal Activity of Nine Medicinal Plants against *Aspergillus* species from Cocoa Beans (*Theobroma cacao*). *Journal of Agriculture and Ecology Research International*, 7, 1-11. <https://doi.org/10.9734/JAERI/2016/24602>
- Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019). Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants : An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. In R. R. Watson (Éd.), *Polyphenols in Plants (Second Edition)*, 243-259. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813768-0.00025-6>
- Ortega-Beltran, A., & Cotty, P. J. (2017). Frequent Shifts in *Aspergillus flavus* Populations Associated with Maize Production in Sonora, Mexico. *Phytopathology*®, 108(3), 412-420. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-08-17-0281-R>
- Padilha, I. Q. M., Pereira, A. V., Rodrigues, O. G., Siqueira-Júnior, J. P., & Pereira, M. do S. V. (2010). Antimicrobial activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. From Northeast Brazil against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20(1), 45-47. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000100010>
- Palumbo, J.D., Baker, J.L., Mahoney, N.E., 2006. Microbial Ecology from Almonds. *Microb. Ecol.*, Vol. 52, 45-52. doi:10.1007/s00248-006-9096-y
- Pankaj, S. K., Shi, H., & Keener, K. M. (2018). A review of novel physical and chemical decontamination technologies for aflatoxin in food. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 73-83. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.11.007>

- Paranagama, P. A., Abeysekera, K. H. T., Abeywickrama, K., & Nugaliyadde, L. (2003). Fungicidal and anti-aflatoxigenic effects of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (Lemongrass) against *Aspergillus flavus* Link. Isolated from stored rice. *Letters in Applied Microbiology*, 37(1), 86-90. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01351.x>
- Peng, Z., Hayasaka, Y., Iland, P. G., Sefton, M., Høj, P., & Waters, E. J. (2001). Quantitative Analysis of Polymeric Procyanidins (Tannins) from Grape (*Vitis vinifera*) Seeds by Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 26-31. <https://doi.org/10.1021/jf000670o>
- Peñuelas-Rubio, O., Arellano-Gil, M., Vargas-Arispuro, I. C., Lares-Villa, F., Cantú-Soto, E. U., Hernández-Rodríguez, S. E., Gutiérrez-Coronado, M. A., & Mungarro-Ibarra, C. (2015). In Vitro bioactivity of creosote bush extracts (*Larrea tridentata*) on the inhibition of postharvest fungi: *Penicillium polonicum*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae* and *Alternaria Tenuissima*, 1(40), 183-198.
- Pereira Filho, J. M., Vieira, E. L., Kamalak, A., Silva, A. M. A., Cezar, M. F., & Beelen, P. (2005). Correlação entre o teor de tanino e a degradabilidade ruminal da matéria seca e proteína bruta do feno de jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* Wild) tratada com hidróxido de sódio. *Livestock Research for Rural Development*, 17(91).
- Pitt, J. I., & Hocking, A. D. (2009). *Fungi and Food Spoilage* (3^e éd.). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>
- Popiel, D., Dawidziuk, A., Koczyk, G., Mackowiak, A., & Marcinkowska, K. (2017). Multiple facets of response to fungicides – the influence of azole treatment on expression of key mycotoxin biosynthetic genes and candidate resistance factors in the control of resistant *Fusarium* strains. *European Journal of Plant Pathology*, 147(4), 773-785. <https://doi.org/10.1007/s10658-016-1042-3>
- Prakash, B., Kedia, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2015). Plant essential oils as food preservatives to control moulds, mycotoxin contamination and oxidative deterioration of agri-food commodities – Potentials and challenges. *Food Control*, 47, 381-391. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.023>
- Price, M. S., Yu, J., Nierman, W. C., Kim, H. S., Pritchard, B., Jacobus, C. A., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., & Payne, G. A. (2006). The aflatoxin pathway regulator AflR induces gene transcription inside and outside of the aflatoxin biosynthetic cluster. *FEMS Microbiology Letters*, 255(2), 275-279. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00084.x>
- Puentes Sánchez, J., Pardo González, C. M., Pardo González, M. B., Navarro Casado, F. J., Puentes Sánchez, R., Méndez González, J. M., González Rojo, J., Juárez Morales, A., & López Fernández, I. M. (2006). Prevention of vascular ulcers and diabetic foot. Non-randomized open clinical evaluation on the effectiveness of « *Mepentol Leche* ». *Revista De Enfermeria (Barcelona, Spain)*, 29(10), 25-30.
- Quintanilla-Licea, R., Mata-Cárdenas, B. D., Vargas-Villarreal, J., Bazaldúa-Rodríguez, A. F., Ángeles-Hernández, I. K., Garza-González, J. N., & Hernández-García, M. E. (2014). Antiprotozoal Activity against *Entamoeba histolytica* of Plants Used in Northeast

- Mexican Traditional Medicine. Bioactive Compounds from *Lippia graveolens* and *Ruta chalepensis*. *Molecules*, 19(12), 21044-21065. <https://doi.org/10.3390/molecules191221044>
- Quintanilla-Licea, R., Vargas-Villarreal, J., Verde-Star, M. J., Rivas-Galindo, V. M., & Torres-Hernández, Á. D. (2020). Antiprotozoal Activity Against *Entamoeba histolytica* of Flavonoids Isolated from *Lippia graveolens* Kunth. *Molecules*, 25(11), 2464. <https://doi.org/10.3390/molecules25112464>
- Rasooli, I., Fakoor, M. H., Yadegarinia, D., Gachkar, L., Allameh, A., & Rezaei, M. B. (2008). Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 122(1-2), 135-139. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.048>
- Rawal, S., & Coulombe, R. A. (2011). Metabolism of aflatoxin B1 in Turkey liver microsomes : The relative roles of cytochromes P450 1A5 and 3A37. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 254(3), 349-354. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.05.010>
- Ren, Y., Jin, J., Zheng, M., Yang, Q., Xing, F., Logrieco, A.F., Rubner, M., Karlsruhe, I., 2020. Ethanol Inhibits Aflatoxin B 1 Biosynthesis in *Aspergillus flavus* by Up-Regulating Oxidative Stress-Related Genes. *Front. Microbiol.*, Vol. 10, 1–12. doi:10.3389/fmicb.2019.02946
- Ridgway, K., Smith, R. M., & Lalljie, S. P. D. (2012). Sample Preparation for Food Contaminant Analysis in J. Pawliszyn (Éd.). *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 819-833. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381373-2.00115-0>
- Ritter, A., Hoeltz, M., & Noll, I. (2011). Toxigenic potential of *Aspergillus flavus* tested in different culture conditions. *Food Science and Technology (Campinas)*, 31, 623-628. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000300011>
- Rivera-Arce, E., Chávez-Soto, M. A., Herrera-Arellano, A., Arzate, S., Agüero, J., Feria-Romero, I. A., Cruz-Guzmán, A., & Lozoya, X. (2007). Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(3), 523-528. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.032>
- Rivera-Arce, E., Gattuso, M., Alvarado, R., Zárate, E., Agüero, J., Feria, I., & Lozoya, X. (2007). Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosa tenuiflora* cortex. *Journal of Ethnopharmacology*, 113(3), 400-408. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.06.023>
- Rosales Aleman, V. (2015). Evaluación del efecto antioxidante y antimicrobiano de los residuos de orégano (*Lippia graveolens*). Thèse de doctorat, Universidad Autonoma Antonio Narro.
- Ross, R. P., Morgan, S., & Hill, C. (2002). Preservation and fermentation : Past, present and future. 79(1-2), 3-16. [https://doi.org/10.1016/s0168-1605\(02\)00174-5](https://doi.org/10.1016/s0168-1605(02)00174-5)
- Roze, L. V., Laivenieks, M., Hong, S.-Y., Wee, J., Wong, S.-S., Vanos, B., Awad, D., Ehrlich, K. C., & Linz, J. E. (2015). Aflatoxin biosynthesis is a novel source of reactive oxygen

- species—A potential redox signal to initiate resistance to oxidative stress? *Toxins*, 7(5), 1411-1430. <https://doi.org/10.3390/toxins7051411>
- Rufino-González, Y., Ponce-macotela, M., González-Maciel, A., Rafael, R., Jiménez-Estrada, M., Angeles, S.-C., & Martínez-Gordillo, M. (2012). In vitro activity of the F-6 fraction of oregano against *Giardia intestinalis*. *Parasitology*, 139, 434-440. <https://doi.org/10.1017/S0031182011002162>
- Ruiz, J. A., Vázquez, R. S., & Hernández, D. I. F. (2009). Caracterización del aceite esencial de orégano liso (*Poliomintha longiflora* Gray) de la localidad infiernillo en el municipio de Higuera, N.L Mexico. *RESPYN Revista Salud Pública y Nutrición*, 10(1). <https://respyn.uanl.mx/index.php/respyn/article/view/229>
- Rushing, B. R., & Selim, M. I. (2019). Aflatoxin B1 : A review on metabolism, toxicity, occurrence in food, occupational exposure, and detoxification methods. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 124, 81-100. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.11.047>
- Rustom, I. Y. S. (1997). Aflatoxin in food and feed : Occurrence, legislation and inactivation by physical methods. *Food Chemistry*, 59(1), 57-67. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(96\)00096-9](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(96)00096-9)
- Sadeghi, A., Ebrahimi, M., Sadeghi, B., Mortazavi, S. A., Resources, N., & Health, C. (2019). Evaluation of safety and antifungal activity of *Lactobacillus reuteri* and *Pediococcus diace-tilactis* isolates against aflatoxigenic. 2, 190-199. <https://doi.org/10.15547/bjvm.2046>
- Sagaste, C. A., Montero, G., Coronado, M. A., Ayala, J. R., León, J. Á., García, C., Rojano, B. A., Rosales, S., & Montes, D. G. (2019). Creosote Bush (*Larrea tridentata*) Extract Assessment as a Green Antioxidant for Biodiesel. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(9). <https://doi.org/10.3390/molecules24091786>
- Sakakibara, M., Difeo, D., Nakatani, N., Timmermann, B., & Mabry, T. J. (1976). Flavonoid methyl ethers on the external leaf surface of *Larrea tridentata* and *L. Divaricata*. *Phytochemistry*, 15(5), 727-731. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)94430-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)94430-3)
- Salas, M. P., Pok, P. S., Resnik, S. L., Pacin, A., & Munitz, M. (2016). Use of citrus flavanones to prevent aflatoxin contamination using response surface methodology. *Food Control*, 60, 533-537. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.026>
- Sánchez, E., Heredia, N., & García, S. (2005). Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of Agave species. *International Journal of Food Microbiology*, 98(3), 271-279. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.009>
- Sanchez-Bayo, F. (2012). Insecticides Mode of Action in Relation to Their Toxicity to Non-Target Organisms. *Journal of Environmental & Analytical Toxicology*. 4, 1-9. <https://doi.org/10.4172/2161-0525.S4-002>

- Sánchez-Hervás, M., Gil, J. V., Bisbal, F., Ramón, D., & Martínez-Culebras, P. V. (2008). Mycobiota and mycotoxin producing fungi from cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 125(3), 336-340. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.04.021>
- Sangmanee, P., Hongpattarakere, T., 2014. Inhibitory of multiple antifungal components produced by *Lactobacillus plantarum* K35 on growth, aflatoxin production and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food. Cont.*, Vol. 40, 224–233. doi:10.1016/j.foodcont.2013.12.005
- Sathishkumar, T., & Baskar, R. (2014). Screening and quantification of phytochemicals in the leaves and flowers of *Tabernaemontana heyneana* Wall. - A near threatened medicinal plant. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 5, 237-243.
- Schallmey, M., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in the use of *Bacillus* species for industrial production. *Canadian Journal of Microbiology*. 17, 1-17. <https://doi.org/10.1139/W03-076>
- 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(3), 407-412. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.019>
- Schneider, E. P., & Dickert, K. J. (1994). Health Costs and Benefits of Fungicide Use in Agriculture. *Journal of Agromedicine*, 1(1), 19-37. https://doi.org/10.1300/J096v01n01_03
- Schreurs, F., Bandyopadhyay, R., Kooyman, C., Ortega-Beltran, A., Akande, A., Konlambigue, M., & Bosch, N. V. den. (2019). Commercial products promoting plant health in African agriculture. In Neuenschwander P., Tamò M. (eds) *Critical issues in plant health: 50 years of research in african agriculture*. 345-163. London, Burleigh Dodds Science Publishing. <https://doi.org/10.19103/as.2018.0043.14>
- Sharma, R. P. (1993). Immunotoxicity of Mycotoxins. *Journal of Dairy Science*, 76(3), 892-897. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77415-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77415-9)
- Sherratt, P., & Hayes, J. (2002). Glutathione S-transferases. In Ioannides C. (ed) *Enzyme Systems that Metabolise Drugs and Other Xenobiotics*. 319-352. John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/0470846305.ch9>
- Shimizu, K., Hicks, J. K., Huang, T.-P., & Keller, N. P. (2003). Pka, Ras and RGS protein interactions regulate activity of AflR, a Zn(II)2Cys6 transcription factor in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 165(3), 1095-1104.
- Siahmoshteh, F., Hamidi-esfahani, Z., Spadaro, D., Shams-ghahfarokhi, M., Razzaghi-abyaneh, M., 2017. Unraveling the mode of antifungal action of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* as potential biocontrol agents against aflatoxigenic *Aspergillus parasiticus*. *J. Food. Cont.*, Vol. 89, 300–307. doi:10.1016/j.foodcont.2017.11.010

- Silva, V. R. (1998). Efecto de la fertilización nitrogenada y fosforada sobre la cobertura foliar, altura de planta, y la composición del aceite esencial del orégano (*Lippia berlandier* Schauer) en el sur del Estado de Chihuahua. Thèse de doctorat, Universidad Autónoma de Chihuahua.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16(3), 144-158.
- Sipos, P., Peles, F., Brassó, D. L., Béri, B., Pusztahelyi, T., Pócsi, I., & Gyóri, Z. (2021). Physical and Chemical Methods for Reduction in Aflatoxin Content of Feed and Food. *Toxins*, 13(3), 204. <https://doi.org/10.3390/toxins13030204>
- Skotti, E., Anastasaki, E., Kanellou, G., Polissiou, M., & Tarantilis, P. A. (2014). Total phenolic content, antioxidant activity and toxicity of aqueous extracts from selected Greek medicinal and aromatic plants. *Industrial Crops and Products*, 53, 46-54. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.013>
- Skouta, R., Morán-Santibañez, K., Valenzuela, C. A., Vasquez, A. H., & Fenelon, K. (2018). Assessing the Antioxidant Properties of *Larrea tridentata* Extract as a Potential Molecular Therapy against Oxidative Stress. *Molecules*, 23(7), 1826. <https://doi.org/10.3390/molecules23071826>
- Snyder, L. R. (1968). Principles of adsorption chromatography: The separation of nonionic organic compounds. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*. 51(6), 1343. <https://doi.org/10.1093/jaoac/51.6.1343>
- Soriano, J. M. (2007). *Micotoxinas en alimentos*. Ed. Díaz de Santos, Madrid. <https://www.editdiazdesantos.com/libros/soriano-del-castillo-jose-miguel-micotoxinas-en-alimentos-L03008080101.html>
- Souza, R. S. O. de, Albuquerque, U. P. de, Monteiro, J. M., & Amorim, E. L. C. de. (2008). Jurema-Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): A review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(5), 937-947. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132008000500010>
- Srivastava, N., Singh, A., Kumari, P., Nishad, J. H., Gautam, V. S., Yadav, M., Bharti, R., Kumar, D., & Kharwar, R. N. (2021). Advances in extraction technologies: Isolation and purification of bioactive compounds from biological materials. In Sinha R. P. & Häder D.P. (Éds.), *Natural Bioactive Compounds*. 409-433. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820655-3.00021-5>
- Stoloff, L. (1989). Aflatoxin is not a probably human carcinogen : The published evidence is sufficient. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 10(3), 272-283. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(89\)90054-8](https://doi.org/10.1016/0273-2300(89)90054-8)
- Storm, I. M. L. D., Rasmussen, R. R., & Rasmussen, P. H. (2014). Occurrence of pre- and post-harvest mycotoxins and other secondary metabolites in Danish maize silage. *Toxins*, 6(8), 2256-2269. <https://doi.org/10.3390/toxins6082256>

- Sudakin, D. L. (2003). Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer : A clinical review. *Journal of Toxicology. Clinical Toxicology*, 41(2), 195-204. <https://doi.org/10.1081/clt-120019137>
- Sun, Q., Shang, B., Wang, L., Lu, Z., & Liu, Y. (2016). Cinnamaldehyde inhibits fungal growth and aflatoxin B1 biosynthesis by modulating the oxidative stress response of *Aspergillus flavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(3), 1355-1364. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7159-z>
- Tanase, C., Coşarcă, S., & Muntean, D.-L. (2019). A Critical Review of Phenolic Compounds Extracted from the Bark of Woody Vascular Plants and Their Potential Biological Activity. *Molecules*, 24(6). <https://doi.org/10.3390/molecules24061182>
- 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*, 23, 38-43. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2018.05.008>
- Temba, M. C., Njobeh, P. B., & Kayitesi, E. (2017). Storage stability of maize-groundnut composite flours and an assessment of aflatoxin B1 and ochratoxin A contamination in flours and porridges. *Food Control*, 71, 178-186. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.033>
- Temple, W. A., Smith, N. A., & Beasley, M. (2008). Management Of Oil Of Citronella Poisoning. *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology*, 29(2), 257-262. <https://doi.org/10.3109/15563659109038618>
- Thippeswamy, S., Mohana, D., Umesh, A., & Kiragandur, M. (2014). Inhibitory Activity of Plant Extracts on Aflatoxin B1 Biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 16, 1123-1132.
- Tian, F., Lee, S. Y., Woo, S. Y., Choi, H. Y., Heo, S., Nah, G., & Chun, H. S. (2021). Transcriptomic responses of *Aspergillus flavus* to temperature and oxidative stresses during aflatoxin production. *Scientific Reports*, 11(1), 2803. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82488-7>
- Tian, J., Huang, B., Luo, X., Zeng, H., Ban, X., He, J., & Wang, Y. (2012). The control of *Aspergillus flavus* with *Cinnamomum jensenianum* Hand. Mazz essential oil and its potential use as a food preservative. *Food Chemistry*, 130(3), 520-527. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.061>
- Tisserand, R., & Young, R. (2014). Essential oil profiles. In *Essential Oil Safety*, 187-482. Elsevier, London. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06241-4.00013-8>
- Tiwari, R., & Rana, C. (2015). Plant secondary metabolites : A review. *IJERGS*, 3, 661-670.
- Torres, A. M., Barros, G. G., Palacios, S. A., Chulze, S. N., & Battilani, P. (2014). Review on pre- and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination. *Food Research International*, 62, 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.02.023>

- Turek, C., & Stintzing, F. C. (2013). Stability of Essential Oils : A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 12(1), 40-53. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12006>
- Turner, P. C., Collinson, A. C., Cheung, Y. B., Gong, Y., Hall, A. J., Prentice, A. M., & Wild, C. P. (2007). Aflatoxin exposure in utero causes growth faltering in Gambian infants. *International Journal of Epidemiology*, 36(5), 1119-1125. <https://doi.org/10.1093/ije/dym122>
- Turner, P. C., Flannery, B., Isitt, C., Ali, M., & Pestka, J. (2012). The role of biomarkers in evaluating human health concerns from fungal contaminants in food. *Nutrition Research Reviews*, 25(1), 162-179. <https://doi.org/10.1017/S095442241200008X>
- Udoh, J. M., Cardwell, K., & Ikotun, T. (2000). Storage structures and aflatoxin content of maize in five agroecological zones of Nigeria. *Journal of Stored Products Research*, 36, 187-201. [https://doi.org/10.1016/S0022-474X\(99\)00042-9](https://doi.org/10.1016/S0022-474X(99)00042-9)
- Vamvakas, S.-S., Chroni, M., Genneos, F., & Gizeli, S. (2021). *Vaccinium myrtillus* L. dry leaf aqueous extracts suppress aflatoxins biosynthesis by *Aspergillus flavus*. *Food Bioscience*, 39, 100790. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100790>
- Van Soest, P. J., & Wine, R. H. (1967). Use of Detergents in the Analysis of Fibrous Feeds. IV. Determination of Plant Cell-Wall Constituents. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 50(1), 50-55. <https://doi.org/10.1093/jaoac/50.1.50>
- Varga, J., Frisvad, J., & Samson, R. (2009). A reappraisal of fungi producing aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 2(3), 263-277. <https://doi.org/10.3920/WMJ2008.1094>
- Velazco Macias, C. G. (2012). *Lippia graveolens*. CONABIO
- Vepsäläinen, J., Auriola, S., Tukiainen, M., Ropponen, N., & Callaway, J. (2005). Isolation and Characterization of Yuremamine, a New Phytoindole. *Planta Medica*, 71(11), 1053-1057. <https://doi.org/10.1055/s-2005-873131>
- Verástegui, M. A., Sánchez, C. A., Heredia, N. L., & García-Alvarado, J. S. (1996). Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahuan desert. *Journal of Ethnopharmacology*, 52(3), 175-177. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)84802-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)84802-1)
- Verheecke, C., 2016. Fungal contamination and mycotoxin production by *Aspergillus spp.* isolated from nuts and sesame seeds. *J. microbiol., biotechnol. food sci.*, Vol. 5, 301–305 doi:10.15414/jmbfs.2016.5.4.301-305
- Verheecke, C., Liboz, T., Darriet, M., Sabaou, N., Mathieu, F., 2014. In vitro interaction of actinomycetes isolates with *Aspergillus flavus* : impact on aflatoxins B1 and B2 production. *Lett. Appl. Microbiol.*, Vol. 58, 597–603. doi:10.1111/lam.12233
- Vila-Donat, P., Marín, S., Sanchis, V., & Ramos, A. J. (2018). A review of the mycotoxin adsorbing agents, with an emphasis on their multi-binding capacity, for animal feed decontamination. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal*

- Published for the British Industrial Biological Research Association, 114, 246-259.*
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.02.044>
- Villavicencio Gutiérrez, E., Cano Pineda, A., & Garcia Cuevas, X. (2010). Metodología para determinar las existencias de orégano (*Lippia graveolens* H.B.K.) en rodales naturales de Parras de la Fuente, Coahuila. *INIFAP, 1*(42), 1-41.
- Vogt, T. (2010). Phenylpropanoid biosynthesis. *Molecular Plant, 3*(1), 2-20.
<https://doi.org/10.1093/mp/ssp106>
- Waliyar, F., Kumar, L., Traoré, A., Ntare, B. R., Diarra, B., & Kodio, O. (2008). Pre- and Postharvest Management of Aflatoxin Contamination in Peanuts. In Leslie J. F., Bandyopadhyay R., Visconti A. *Mycotoxins : Detection Methods, Management, Public Health and Agricultural Trade.* 209-218. CAB International.
<https://doi.org/10.1079/9781845930820.0209>
- Waliyar, F., Osiru, M., Sudini, H., & Njoroge, S. (2013). Reducing aflatoxins in groundnuts through integrated management and biocontrol. *Aflatoxins - Finding Solutions for Improved Food Safety, 1-2.*
- Waterman, P. G., & Mole, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites.* Oxford.
- Wegglar, B. A., Gruber, B., Teehan, P., Jaramillo, R., & Dorman, F. L. (2020). Inlets and sampling. In Snow N. H. (Éd.), *Separation Science and Technology. 12,* 141-203. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813745-1.00005-2>
- Wheeler, K. A., Hurdman, B. F., & Pitt, J. I. (1991). Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *International Journal of Food Microbiology, 12*(2-3), 141-149. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90063-u](https://doi.org/10.1016/0168-1605(91)90063-u)
- Wild, C. P., & Montesano, R. (2009). A model of interaction : Aflatoxins and hepatitis viruses in liver cancer aetiology and prevention. *Cancer Letters, 286*(1), 22-28.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.02.053>
- Wild, C. P., Rasheed, F. N., Jawla, M. F., Hall, A. J., Jansen, L. A., & Montesano, R. (1991). In-utero exposure to aflatoxin in west Africa. *Lancet, 337*(8757), 1602.
[https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)93295-k](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)93295-k)
- Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M., & 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*(5), 1106-1122. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.5.1106>
- Wu, F., & Khlangwiset, P. (2010). Health economic impacts and cost-effectiveness of aflatoxin reduction strategies in Africa : Case studies in biocontrol and postharvest interventions. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment, 27*(4), 496-509.
<https://doi.org/10.1080/19440040903437865>

- Xiang, F., Zhao, Q., Zhao, K., Pei, H., & Tao, F. (2020). The Efficacy of Composite Essential Oils against Aflatoxigenic Fungus *Aspergillus flavus* in Maize. *Toxins*, *12*, 562. <https://doi.org/10.3390/toxins12090562>
- Yu, J. (2012). Current Understanding on Aflatoxin Biosynthesis and Future Perspective in Reducing Aflatoxin Contamination. *Toxins*, *4*(11), 1024-1057. <https://doi.org/10.3390/toxins4111024>
- Yu, J., & Ehrlich, K. (2011). Aflatoxin Biosynthetic Pathway and Pathway Genes. In *Aflatoxins—Biochemistry and molecular biology*. <https://doi.org/10.5772/23034>
- Yu, J.-H., & Keller, N. (2005). Regulation of secondary metabolism in filamentous fungi. *Annual Review of Phytopathology*, *43*, 437-458. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140214>
- Zhang, Q.-W., Lin, L.-G., & Ye, W.-C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine*, *13*(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>
- Zhao, X., Zhi, Q.-Q., Li, J.-Y., Keller, N. P., & He, Z.-M. (2018). The Antioxidant Gallic Acid Inhibits Aflatoxin Formation in *Aspergillus flavus* by Modulating Transcription Factors FarB and CreA. *Toxins*, *10*(7). <https://doi.org/10.3390/toxins10070270>

Extraction-Purification-Formulation de composés naturels capables de bloquer la synthèse de l'Aflatoxine B1

Sous la direction de : Pr. Jean-Denis Bailly et Dr. Celine Mathieu

L'aflatoxine B1 (AFB1) est une mycotoxine cancérigène pour l'homme contaminant de nombreux aliments. Classiquement considérée comme un danger dans les régions chaudes, les changements climatiques élargissent la zone de distribution de cette mycotoxine.

L'objectif principal de cette étude est de contribuer à l'élaboration d'une stratégie de protection éco-responsable et efficace, basée sur l'utilisation d'extraits de plantes pour inhiber la production d'AFB1 chez *A. flavus* et améliorer ainsi la sécurité des aliments de l'Homme et l'animal.

Les extraits aqueux de trois plantes endémiques mexicaines (*Mimosa tenuiflora*, *Larrea tridentata* et *Lippia graveolens*) ont été testés pour leur capacité à bloquer la synthèse d'AFB1 sans moduler la croissance fongique. L'activité de l'extrait de *M. tenuiflora* a pu être reliée à sa forte teneur en tanins condensés. Nous avons aussi pu montrer que cet extrait agit par inhibition de l'expression des gènes du cluster de l'AFB1. Pour les trois extraits, il existe un lien entre richesse en composés phénoliques et capacité à inhiber l'AFB1 même si les molécules responsables semblent de nature différente.

Les composés phénoliques n'étant pas toujours stables dans le temps, nous avons testé la capacité de la micro-encapsulation dans différents bio-polymères à stabiliser l'activité anti-aflatoxine de l'extrait de *M. tenuiflora*. Il apparaît que l'encapsulation avec des polysaccharides permet une meilleure conservation de l'activité que la congélation à -20°C.

Mots clés : Aflatoxine B1 - *Aspergillus flavus* - Extraits naturels - Fractionnement bioguidé - Polyphénols - Activité antioxydante - Stress oxydatif - Microparticules - Stratégie de lutte.

Extraction-Purification-Formulation of natural compounds capable of blocking the synthesis of Aflatoxin B1

Under the supervision of: Pr. Jean-Denis Bailly and Dr. Celine Mathieu

Aflatoxin B1 (AFB1) is a human carcinogenic mycotoxin contaminating many foods. Classically considered a hazard in hot regions, climate change is expanding the range of this mycotoxin.

The main objective of this study is to contribute to the development of an eco-responsible and effective protection strategy, based on the use of plant extracts to inhibit the production of AFB1 in *A. flavus* and thus improve food safety for humans and animals.

Aqueous extracts of three Mexican endemic plants (*Mimosa tenuiflora*, *Larrea tridentata* and *Lippia graveolens*) were tested for their ability to block AFB1 synthesis without modulating fungal growth. The activity of *M. tenuiflora* extract could be linked to its high content of condensed tannins. We were also able to show that this extract acts by inhibiting the expression of the AFB1 cluster genes. For the three extracts, there is a link between richness in phenolic compounds and the ability to inhibit AFB1 even though the molecules responsible appear to be of a different nature.

Since phenolic compounds are not always stable over time, we tested the ability of microencapsulation in different biopolymers to stabilize the anti-aflatoxin activity of *M. tenuiflora* extract. It appears that encapsulation with polysaccharides allows better retention of activity than freezing at -20 ° C.

Keywords: Aflatoxin B1 - *Aspergillus flavus* - Natural extracts - Bioguided fractionation - Polyphenols - Antioxidant activity - Oxidative stress - Microparticles - Control strategy.