



Efficacité des extraits de plantes dans la lutte contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide en post-récolte au Bénin

Euloge S. ADJOU et Mohamed M. SOUMANOU*

Laboratoire d'Etude et de Recherche en Chimie Appliquée, École Polytechnique d'Abomey-Calavi, Université d'Abomey-Calavi. 01BP2009 Cotonou, Bénin.

*Adresse pour correspondance : msoumanoufr@yahoo.fr; mohamed.soumanou@epac.uac.bj

Original submitted in on 26th August 2013 Published online at www.m.elewa.org on 31st October 2013.

RÉSUMÉ

Objectifs : Le présent travail vise à étudier l'efficacité des extraits de plantes notamment les huiles essentielles et les extraits non volatils de dix plantes alimentaires et médicinales sur la croissance des moisissures toxigènes responsables de l'altération des graines d'arachide en post récolte au Bénin.

Méthodologie et Résultats : L'échantillonnage de l'arachide a été effectué dans quatre (04) zones agro-écologiques au Bénin, suivi de l'évaluation de la mycoflore d'altération et de leur pouvoir toxigène. Des tests antifongiques ont été réalisés avec différents extraits végétaux afin d'évaluer leurs potentiels antimicrobiens contre les souches fongiques isolées de l'arachide en post-récolte. Les résultats de l'évaluation de la pression parasitaire fongique indiquent que la charge mycologique est très élevée dans les échantillons d'arachide collectés au Sud et au Centre du Bénin. La mycoflore isolée appartient essentiellement aux genres *Aspergillus* et *Fusarium*. Les espèces de moisissures identifiées sont principalement *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* et *Mucor spp.* Les tests antifongiques *in vitro* ont montré que les huiles essentielles possèdent des activités antifongiques prononcées à faible concentration contrairement aux extraits non volatils. Cependant, seuls les huiles essentielles et les extraits aqueux de *Ocimum gratissimum*, *Ocimum canum*, *Hyptis suaveolens*, *Ageratum conyzoides* et de *Lantana camara* ont une activité antifongique très prononcée sur les souches toxigènes *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium oxysporum* testées.

Conclusion : Le potentiel antifongique de ces plantes offre donc une approche novatrice de la gestion intégrée des stocks d'arachide en post-récolte.

Mots clés : arachide, moisissures, végétaux, activité antifongique.

Efficacy of plant extracts against toxinogenic fungi on stored peanut in Benin

Abstract

Objectives: The present work aims to study the effectiveness of plant extracts (essential oils and non-volatile extracts) of ten medicinal plants on the growth of toxinogenic mold spoilage of peanut in Benin.

Methodology and Results: Peanuts samples were collected from four (04) agroecological zones in Benin and the occurrence of spoilage fungi and their toxinogenic potential were evaluated. The antifungal potential of plants extracts against toxinogenic fungi isolated from peanuts samples was investigated. The results of evaluation of the fungal parasite pressure indicate that the mycological load is very high in peanut samples collected in southern and central Benin. The isolated fungal population belongs essentially to *Aspergillus* and *Fusarium*. Mold species identified are mainly *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus Niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium graminearum* and *Mucor spp.* Plants investigated have a good extraction efficiency. *In-vitro* antifungal assay showed that essential oils

have antifungal activities pronounced at low concentrations in contrast to non-volatile extracts. However, only essential oils and aqueous extracts of *Ocimum gratissimum*, *Ocimum canum*, *Hyptis suaveolens*, *Ageratum conyzoides* and *Lantana camara* have very pronounced antifungal activity on toxinogenic strains of *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, and *Fusarium oxysporum*.

Conclusions and application of finding: These plants extracts, with fungal growth and mycotoxin inhibitory properties, offer a novel approach to the management of storage, thus opening up the possibility to prevent mold contamination on stored peanuts.

Keywords: peanut, fungi, plants, antifungal activity.

INTRODUCTION

L'arachide est la treizième culture, la quatrième source d'huile comestible et la troisième source importante de protéines végétales au plan mondial. Il est cultivé sur 26,4 millions d'hectare dans le monde pour une production totale de 36,1 millions de tonnes et une productivité moyenne de 1,4 tonne par hectare (Faostat, 2011). Au Bénin, la culture de l'arachide est essentiellement destinée à la consommation locale comme arachide de bouche, à la production d'huile utilisée en cuisine, en savonnerie et des produits dérivés (Godjo *et al.*, 2002). Malheureusement, l'arachide constitue le substrat de prédilection des moisissures notamment *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus*. La contamination débute au champ et est favorisée par les conditions culturales, les attaques récurrentes des insectes et les sécheresses en fin de cycle (Ruppel *et al.*, 2004). Parmi toutes les mycotoxines, l'aflatoxine B1 (AFB1) produit par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* est la forme la plus toxique (hépatotoxique, tératogène et mutagène) pour les mammifères (Tabuc, 2007). Il a été classé comme cancérigène humain de catégorie 1 par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC, 1993). La lutte chimique demeure la principale mesure pour réduire l'incidence des contaminations post-récoltes dans les produits alimentaires. En effet, les produits antimicrobiens appartenant aux groupes des benzimidazoles, les hydrocarbures aromatiques et des inhibiteurs de la biosynthèse des stérols sont souvent utilisés pour les traitements post-récoltes (Hidalgo *et al.*, 1998). Cependant, l'application à des concentrations élevées de ces produits chimiques synthétiques dans une perspective de contrôle post-récolte des

denrées alimentaires augmente le risque de résidus toxiques dans les produits alimentaires (Moosavy *et al.*, 2008). En raison de la sensibilité croissante des consommateurs à cette pollution résiduelle et les effets toxiques de nombreux fongicides de synthèse, l'importance de l'utilisation de produits alternatifs naturels devient nécessaire (Bankole, 2004). De même, la restriction imposée par l'industrie alimentaire et les organismes de réglementation sur l'utilisation de certains additifs alimentaires synthétiques ont conduit à un regain d'intérêt dans la recherche d'alternatives, comme des composés antimicrobiens naturels, en particulier ceux d'origine végétale (Hammer *et al.*, 1999). Les huiles essentielles ainsi que des composés dérivés possèdent d'importantes activités dont l'activité antimicrobienne est la plus étudiée (Hammer *et al.*, 2003; Yehouenou *et al.*, 2010). L'utilisation des huiles essentielles, en tant qu'agents antimicrobiens présente deux avantages principaux: le premier est leur origine naturelle qui signifie plus de sécurité pour la population et l'environnement et la seconde est qu'elles ont été considérées à faible risque de développement de la résistance par des microorganismes pathogènes (Tatsadjieu *et al.*, 2010). Des études et des enquêtes ethnobotaniques préliminaires ont révélé que des plantes sont également utilisées pour conserver des produits alimentaires (Illiassa, 2004). Ainsi, le présent travail axé sur l'étude des propriétés antifongiques des extraits végétaux sur les moisissures toxigènes isolées de l'arachide vise à mettre au point un biofongicide efficace dans la conservation de l'arachide en post-récolte au Bénin.

MATERIELS ET METHODE

Collecte du matériel végétal : Le matériel végétal utilisé est constitué des feuilles fraîches de 10 plantes alimentaires et médicinales acclimatées au

Bénin et appartenant à 7 familles botaniques (tableau 1).

Tableau 1. Plantes utilisées, lieux et zones de collecte

Plantes	Familles	Partie de la plante	Lieu de collecte
<i>Ocimum gratissimum</i>	Lamiaceae	Feuilles	Ouémé-Plateau
<i>Ocimum canum</i>	Lamiaceae	Feuilles	Ouémé –Plateau
<i>Hyptis suaveolens</i>	Lamiaceae	Feuilles	Plateau d'Abomey-Calavi
<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	Feuilles	Cotonou
<i>Mentha spicata</i>	Lamiaceae	Feuilles	Cotonou
<i>Ageratum conyzoides</i>	Astaraceae	Feuilles	Bantè
<i>Chromolaena odorata</i>	Astaraceae	Feuilles	Plateau d'Abomey-Calavi
<i>Aspilia africana</i>	Astaraceae	Feuilles	Plateau d'Abomey-Calavi
<i>Lantana camara</i>	Verbenaceae	Feuilles	Plateau d'Abomey-Calavi
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Myrtaceae	Feuilles	Plateau d'Abomey-Calavi

Extraction des huiles essentielles : L'extraction des huiles essentielles (HE) a été réalisée par hydrodistillation grâce à un appareil de type Clevenger. L'huile essentielle séparée de la phase aqueuse est été séchée sur le sulfate de sodium (Na₂SO₄) et conservé à 5°C à l'obscurité. Le rendement d'extraction (R) est exprimé par rapport au matériel végétal frais et son calcul s'est fait de la manière suivante :

$$R\% = (M_h / M_s) \times 100$$

où **M_h** est la masse d'huile essentielle obtenue et **M_s** représente la masse de matière végétale utilisée.

Obtention des fractions non volatiles : Pour la préparation des différents extraits non volatils, le matériel végétal a été séché à l'ombre pendant deux semaines puis les feuilles sèches sont réduites en poudre qui et sont ensuite utilisées pour la préparation des différents types d'extrait. Il s'agit des extraits éthanolique, semi-éthanolique et aqueux. Pour la préparation des extraits éthanoliques, 100 grammes de chaque poudre de feuille ont été prélevés et 500 millilitres d'éthanol absolu y sont ajoutés. Pour les extraits semi-éthanoliques, 100 grammes de chaque poudre de feuille ont été prélevés puis 250 millilitres d'éthanol absolu et 250 millilitres d'eau distillée y sont ajoutés. Les extraits aqueux sont obtenus en prélevant 100 grammes de chaque poudre de feuille auxquelles sont ajoutées 500 millilitres d'eau distillée bouillante à 100° C. Le mélange ainsi obtenu est laissé sous agitation continue pendant 72 h puis filtré. Le filtrat ainsi obtenu est concentré sous pression réduite dans un évaporateur rotatif à une température de 60°C. Les rendements d'extraction ont été déterminés par rapport à la quantité de matière végétale utilisée selon la formule:

$$R\% = (M_e / M_s) \times 100$$

où **M_e** est la masse de l'extrait obtenu et **M_s** représente la masse de matière sèche réduite en poudre utilisé.

Échantillonnage de l'arachide : Au total, 86 échantillons d'arachide ont été collectés dans différentes localités de production d'arachide au Bénin (*Avrankou, Adjarra, Pahou, Ouidah, Bohicon, Glazoué, Savalou, Wèssè, Kèrè, Dassa, BaniGbè et Bassila, Pira, Natitingou, Takissari, Tchoudigou*). Chaque échantillon est constitué de 500 g d'arachide non décortiquée, collectée sur cinq différents sites dans chaque zone d'étude, excepté Bohicon et Savalou où huit sites de collecte ont été investigués car ces localités font partie des grandes zones de production d'arachide au Bénin.

Évaluation de la pression parasitaire fongique : Afin d'évaluer l'étendue de la contamination par les moisissures dans les différents échantillons d'arachide collectés, le taux de contamination fongique des échantillons a été investigué. La technique de l'ensemencement direct (*Direct Plating*) décrit par Pitt et al. (1994) a été utilisée. C'est l'une des méthodes appropriées pour détecter, évaluer le taux de contamination des échantillons et isoler des mycètes des denrées alimentaires (N'Guyen, 2007). Par échantillon, 50 gousses d'arachide ont été prélevées puis décortiquées. Les graines d'arachide ainsi obtenues (une centaine environ) ont été désinfectées en surface grâce à une solution chlorée (0,4%) pendant une minute à température ambiante. Elles sont ensuite placées sur le milieu de culture Yeast Extract Sucrose Agar (YES) préalablement coulé dans des boîtes de Pétri de 9 cm de diamètre. Les boîtes de Pétri ainsi ensemencées sont ensuite incubées à 25°C pendant cinq jours. Cette méthode permet d'isoler la flore fongique se trouvant à l'intérieur des graines. Le taux de contamination (T_c) par échantillon a été calculé selon la formule suivante :

$$T_c = (N_i / N_T) \times 100$$

où N_i représente le nombre de graines présentant un développement de moisissures et N_T le nombre total de graines.

La méthode d'ensemencement par dilution a été également utilisée dans le but de rechercher la flore fongique se trouvant à la surface des graines. La technique utilisée est celle décrite par Nguyen (2007). Vingt-cinq grammes de chaque échantillon ont été additionnés à 225 ml d'eau peptonée tamponée. Le mélange a été agité pendant 15 minutes. 0,1 millilitre de cette suspension a été étalée sur le milieu de culture YES. Les boîtes de Pétri ont été incubés à 25°C pendant 5 jours.

Isolement et identification des mycètes : Les moisissures qui se sont développées sur les différents milieux de culture ont été purifiées par repiquages répétés. Les cultures pures de moisissures ont été examinées macroscopiquement et leur identification a été réalisée à l'aide du schéma taxonomique basé sur l'aspect des vésicules, des métula, des phialides et l'onctogénicité des spores en utilisant la méthode décrite par Singh *et al.* (1991), Filtenborg *et al.* (1995) et Tabuc (2007). Après identification, la fréquence d'apparition de chaque type de moisissure a été enregistrée.

Étude du potentiel toxigène : Le potentiel aflatoxinogène des souches d'*Aspergillus* isolées des différents échantillons d'arachide a été étudié en utilisant des méthodes basées sur les *Techniques de Détection Rapide* (TDR). Le milieu de culture utilisé est le Dessicated Coconut Agar (DCA). La technique utilisée est celle décrite par Atanda *et al.* (2011) comme suit: environ 20 ml de milieu de DCA ont été coulés dans des boîtes de Pétri en verre. Chaque boîte de Pétri a été inoculé avec 40 μ l de suspension de spores issue des souches d'*Aspergillus* isolées des différents échantillons d'arachide collectées. Chaque suspension de spores a été collectée en ajoutant 10 ml d'eau distillée stérile au milieu de culture contenant la souche fongique à étudier initialement conservé sur le milieu YES à 4°C. Les boîtes de pétri inoculées ont été incubées à 30 °C pendant 48 h et les caractéristiques du milieu de culture ont été examinées : le verso de chaque boîte de Pétri a été observé tous les jours pendant 8 jours à 25°C sous la lumière UV à la longueur d'onde de 365 nm pour vérifier la présence d'un anneau de fluorescence (bleu / bleu verte) qui indique la production d'aflatoxines par les souches fongiques dans le milieu de culture (Sultan et Magan 2010; Atanda *et al.*, 2011).

Tests antifongiques : L'activité antifongique des huiles essentielles (HE) et des extraits non volatils (ENV) a été recherchée *in vitro* et a pour but de déterminer la concentration minimale inhibitrice (CMI) des HE et des ENV. Ces tests ont été effectués sur un

milieu solide et ont consisté essentiellement à la réalisation du criblable antifongique et à la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI).

Criblage antifongique : Le criblage antifongique a été réalisé suivant la méthode de contact directe décrite par Mishra et Dubey (1994) rapporté par Tatsadjieu *et al.*, (2010). Cette méthode permet d'identifier et de sélectionner les extraits de plantes efficaces contre des moisissures. Ce test est décrit comme suit : dans des boîtes de Pétri contenant chacun 20 ml du milieu de culture YES stérilisé à l'autoclave pendant 15 min à 121°C et refroidi à 45°C, on ajoute aseptiquement 500 μ L d'huile essentielle et du Tween 80, suivi d'une rotation manuelle, afin d'assurer la dispersion totale de l'huile essentielle dans le milieu de culture. Pour les extraits non volatils, 2 ml ont été prélevés et ajoutés au milieu de culture (YES) en fusion, suivi de rotation manuelle afin d'assurer la dispersion totale de l'extrait. Dans chaque boîte, un disque mycélien de diamètre égal à 6 mm de la souche de moisissure à tester est prélevé et aseptiquement déposé au centre du milieu de culture contenant l'extrait de plante. Dans chaque cas, des essais témoins (milieu de culture sans extraits de plante) ont été réalisés. Les boîtes ont été placées à l'étuve à 25°C pendant 7 jours. Les diamètres de croissance mycélienne sont mesurés et comparés à celui des témoins. Les résultats obtenus ont permis de calculer le Pourcentage d'Inhibition (PI) selon la formule

$$PI (\%) = (D - Di) / D \text{ (Kumar et al., 2007)}$$

où D représente le diamètre de la croissance mycélienne dans un milieu sans huile essentielle (témoin) et Di , le diamètre de la croissance mycélienne en présence d'extraits végétaux.

Détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices : La détermination des CMI a concerné uniquement les extraits végétaux actifs sur les souches fongiques testées, c'est-à-dire, les extraits ayant montré un Pourcentage d'Inhibition (PI) égal à 100% lors du criblage antifongique. Elle a été réalisée par la méthode décrite par Billerbeck *et al.* (2001). Le milieu de culture utilisé pour cette recherche est le milieu gélosé YES. Elle a consisté à incorporer les extraits végétaux à des concentrations variables dans le milieu de culture en fusion. En effet, différentes concentrations d'huile essentielle (20 ml de milieu de culture et des quantités croissantes d'extraits : 100 μ L, 110 μ L, 120 μ L, 130 μ L, 140 μ L, 150 μ L, 160 μ L, 170 μ L, 180 μ L, 190 μ L, 200 μ L, 300 μ L, 400 μ L, et 500 μ L) ont été testées par leur addition au milieu de culture. Pour les extraits non volatils, différentes quantités (0,5mL ; 1 ml ; 1,5 ml et 2 ml) ont été prélevées et additionnées au milieu de culture (20mL) en fusion. Les boîtes sont agitées puis laissées

refroidies pendant 30 min à température ambiante pour permettre une meilleure solidification. Ensuite un disque mycélien de 6 cm de diamètre de la moisissure à tester a été transplanté sur les milieux pré-coulés (milieux de culture contenant l'extrait de plante à tester) à différentes concentrations. Ces tests ont été réalisés à raison de trois boîtes par concentration. Ces boîtes ont été incubées à 25°C et la croissance mycélienne a été prise toutes les 24 heures, en mesurant la moyenne de deux diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la boîte de pétri, pendant 7 jours (Mishra et Dubey, 1994 ; Khallil, 2001). La CMI correspond alors à la plus faible concentration à partir de laquelle aucune croissance fongique n'est observée. Aux concentrations expérimentales où aucune croissance, ni germination n'est observée, nous avons testé l'activité fongicide ou fongistatique. Ce test consiste à prélever le disque mycélien qui n'a pas poussé en fin d'incubation de la boîte de Pétri et à le réintroduire dans un milieu de culture neuf sans extrait de plante. Dans le cas où la croissance mycélienne est toujours inhibée, on parle d'activité fongicide de l'extrait naturel et dans le cas contraire, il s'agit de l'activité fongistatique (Yehouenou et al., 2012)

Étude du potentiel anti-aflatoxinogène des extraits végétaux : Les tests antiaflatoxinogènes ont été réalisés en utilisant la méthode décrite par Tatsadjieu et al. (2009). Les milieux de culture DCA avec différentes concentrations d'HE (5,0 ; 5,5 ; 6,0 ; 6,5 et 7

µL/ml) sont préparés par addition d'une quantité appropriée d'HE et de Tween 80 au milieu de culture (DCA) suivie d'une rotation manuelle favorisant la dispersion de l'HE dans le milieu de culture. Chaque boîte de Pétri a été inoculée avec 40 µl de suspension de spores d'*Aspergillus* toxigènes isolées des différents échantillons d'arachide. Chaque suspension de spores a été collectée comme décrit ci-dessus. Les boîtes de pétri inoculées ont été incubées à 30 °C pendant 48 h et certaines caractéristiques du milieu ont été examinées : le verso de chaque boîte de pétri a été observé par jour pendant 8 jours à 25°C sous la lumière UV à la longueur d'onde de 365 nm pour vérifier la présence d'un anneau de fluorescence (bleu / bleu verte) qui indique la présence d'aflatoxines (Sultan et Magan 2010 ; Atanda et al., 2011). Un témoin négatif, constitué du milieu de culture DCA incorporé d'huile essentielle et nonensemencé par des souches fongiques, est aussi réalisé et visualisé périodiquement sous une lumière UV (365 nm).

Analyses statistiques : Les résultats ont été analysés par la méthode de variance (ANOVA) à l'aide du logiciel STATISTICA (Stat., Soft, Inc, 1995). La comparaison des moyennes est effectuée par le test de la plus petite différence significative LSD (Least Significant Difference). Cette méthode d'analyse consiste à chercher les moyennes qui diffèrent significativement les unes des autres. Les différences sont significatives lorsque $P < 0.05$.

RESULTATS ET DISCUSSION

Rendements d'extraction : Les rendements obtenus après extraction des huiles essentielles des dix (10) plantes investiguées sont présentés dans le *tableau 2*. L'analyse de ce tableau montre que les rendements en huile essentielle varient d'une espèce végétale à une autre. Ces rendements sont compris entre $0,09 \pm 0,02\%$ et $4,76 \pm 0,05\%$. Parmi les Lamiaceae investiguées, les feuilles de *Ocimum gratissimum* sont les plus riches en huile essentielle avec un rendement de $1,24 \pm 0,03\%$. Les rendements en huiles essentielles des feuilles de *Mentha piperita* et de *Mentha spicata* sont respectivement de $1,17 \pm 0,06\%$ et $0,96 \pm 0,03\%$ et ceux de *Ocimum canum* et de *Hyptis suaveolens* sont respectivement de $0,99 \pm 0,06\%$ et $0,23 \pm 0,02\%$. Quant aux Asteraceae, les feuilles de *Ageratum conyzoides* sont plus riches en huile essentielle avec un rendement de $0,56 \pm 0,01\%$, suivi de *Chromolaena odorata* et de *Aspilia africana* qui possèdent des rendements de $0,31 \pm 0,04\%$ et $0,09 \pm 0,02\%$ respectivement. S'agissant de la famille des Myrtaceae, les feuilles de *Eucalyptus citriodora* possèdent un rendement en huile essentielle de $2,93 \pm 0,02\%$. *Lantana camara* appartenant à la famille des Verbenaceae a un rendement d'extraction de 0,21

$\pm 0,02\%$. De l'analyse de ces résultats, il ressort que les rendements en huile essentielle des feuilles de *Chromolaena odorata* et de *Lantana camara* sont proches de ceux obtenus respectivement par Alitonou (2002) et Noudogbessi et al. (2006) à partir des feuilles récoltées à Abomey-calavi. Le rendement d'extraction en huile essentielle des feuilles de *Hyptis suaveolens* est inférieur à celui obtenu par Sharma et al. (2004). Dans le cas d'*Ocimum gratissimum*, le rendement est proche de celui obtenu par Camara (2009) qui est de 1,26% mais supérieur aux rendements obtenus par Tonzibo (2003) et Alitonou (2006) qui est de 0,8%. Le rendement de l'huile essentielle de *Ageratum conyzoides* est proche de celui obtenu par Kanko (2010) qui est de 0,6%. Ces différences observées au niveau des rendements pourraient être liées à la zone de collecte, la nature du sol, et le stade de développement de la plante.

Les rendements obtenus au niveau des extraits non volatils sont présentés dans le *tableau 3*. L'analyse des différents résultats montre que les rendements d'extraction varient non seulement en fonction des plantes et aussi de la famille botanique. Les rendements obtenus varient de 6,16% à 34,39%. Les

rendements varient aussi en fonction du type de solvant utilisé pour l'extraction. En effet, pour *Ocimum gratissimum*, les valeurs obtenues sont respectivement de 14,65% pour l'extrait éthanolique, 7,28% pour l'extrait semi éthanolique et 8,46% pour l'extrait aqueux. Ces rendements sont supérieurs à ceux obtenus par Couthon (2009), au niveau des extraits

éthanoliques d'*O.gratissimum*. Cette variation au niveau des rendements pourraient s'expliquer par la teneur en composés capables d'être extraits par le solvant utilisé. La zone de collecte, la nature du sol, et le stade de développement de la plante pourraient également influencer le rendement d'extraction.

Tableau 2. Rendements en huiles essentielles des plantes étudiées

Plantes	Familles	Rendement (%)
<i>Ocimum gratissimum</i>	Lamiaceae	1,24±0,03
<i>Ocimum canum</i>	Lamiaceae	0,99±0,06
<i>Hyptis suaveolens</i>	Lamiaceae	0,23±0,02
<i>Mentha piperita</i>	Lamiaceae	1,17±0,06
<i>Mentha spicata</i>	Lamiaceae	0,96 ±0,03
<i>Ageratum conyzoides</i>	Asteraceae	0,56±0,01
<i>Chromolaena odorata</i>	Asteraceae	0,31±0,04
<i>Aspilia africana</i>	Asteraceae	0,09±0,02
<i>Eucalyptus citriodora</i>	Myrtaceae	2,93±0,08
<i>Lantana camara</i>	Verbenaceae	0,21±0,02

Tableau 3. Rendements en extraits non volatils des plantes étudiées

	Rendements d'extraction (%)		
	Extrait éthanolique	Extrait semi-éthanolique	Extrait aqueux
<i>Ocimum gratissimum</i>	14,65±0,01	7,28±0,06	8,46±0,07
<i>Ocimum canum</i>	11,63±0,47	9,03±0,03	8,09±0,06
<i>Hyptis suaveolens</i>	21,95±0,03	10,51±0,09	34,39±0,09
<i>Mentha piperita</i>	16,39±0,08	14,82±0,07	12,50±0,08
<i>Mentha spicata</i>	18,31±0,05	10,42±0,09	6,21±0,09
<i>Ageratum conyzoides</i>	23,58±0,02	26,17±0,04	15,01±0,07
<i>Chromolaena odorata</i>	15,70±0,09	6,56±0,05	16,29±0,08
<i>Aspilia africana</i>	11,92±0,08	6,16±0,09	8,23±0,11
<i>Syzigium aromaticum</i>	16,95±0,05	12,51±0,14	36,39±0,10
<i>Eucalyptus citriodora</i>	22,7±0,03	27,28±0,13	6,64±0,07
<i>Lantana camara</i>	7,65±0,06	11,38±0,07	15,16±0,09
<i>Clausena anisata</i>	14,63±0,07	12,03±0,04	9,09±0,04

Pression parasitaire fongique dans les échantillons d'arachide : Les résultats de l'évaluation du degré de contamination fongique des échantillons d'arachide en fonction des sites de collecte et des zones agro-écologiques montrent que la contamination des échantillons varie en fonction du site de collecte et de la zone agro-écologique avec un taux compris entre 20-100%. Les taux de contamination les plus élevés sont obtenus dans les échantillons en provenance du Sud et du Centre Bénin, correspondant respectivement au

zone agro-écologique VIII : *Zone des pêcheries et des cultures maraîchères* et au Zone agro-écologique V : *Zone cotonnière du Centre Bénin*. Dans ces zones, l'humidité de l'air est relativement élevée toute l'année. Par contre, dans la Zone agro-écologique IV : *Zone Ouest-Atacora*, la contamination fongique est relativement faible (*tableau 4*). Ces résultats confirment les travaux de Adjou et al. (2012) portant sur l'évaluation de la contamination en mycotoxines (AFB₁, AFB₂, AFG₁ et AFG₂) dans les échantillons de galettes

d'arachide collectés dans les différentes zones agro-écologiques du Bénin. En effet, cette étude indiquait que la contamination en mycotoxines des échantillons était aussi plus importante au Sud et au Centre Bénin. Cette forte pression parasitaire observée au sud et au centre du Bénin pourrait être en relation avec les conditions climatiques. En effet, le Bénin est caractérisé par un climat globalement chaud et humide.

Le sud influencé par l'Alizé maritime (mousson), possède un climat subéquatorial de type guinéen et caractérisé par une forte humidité. Le Nord influencé par l'Alizé continental (harmattan) présente un climat tropical de type soudanien caractérisé par des températures plus élevées, une moindre humidité et des précipitations annuelles faibles.

Tableau 4.Contamination fongique naturelle des échantillons d'arachide collectés dans différentes zones agro-écologiques du Bénin

Zones agro écologiques	Sites de collecte	Taux de contamination fongique (%)*	Prévalence de la Contamination par zone agro écologique (%)*
Zone IV : Zone Ouest-Atacora	Natitingou	20a	53,33a
	Takissari	50b	
	Tchoundégou	90c	
Zone V : Zone cotonnière du Centre Bénin	Bassila	80c	88,75b
	Pira	100c	
	Kèrè	100c	
	Savalou	100c	
	Dassa	40b	
	Bannigbé	100c	
	Glazoué	100c	
Zone VI : Zone des terres de barre	Wessè	90c	73,33b
	Bohicon	40b	
	Adjarra	100c	
Zone VIII : Zone des pêcheries et les cultures maraîchères.	Avrankou	80c	90b
	Pahou	80c	
	Ouidah	100c	

* Les valeurs sont des moyennes (n= 3). Les valeurs portant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$)

Flore fongique contaminant l'arachide en post-récolte : L'étude de la mycoflore fongique contaminant l'arachide en post-récolte au Bénin a permis de montrer que ces moisissures appartiennent majoritairement aux genres *Aspergillus* et *Fusarium*. Les différents isolats identifiés sont *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* et *Mucor spp.* Ces résultats sont similaires à ceux de Nesci et al. (2011) qui ont également rapporté que ces moisissures constituent les grands groupes fongiques contaminant l'arachide en post-récolte. Les résultats de l'étude du potentiel toxigène basée sur les Techniques de Détection Rapide (TDR) des

moisissures aflatoxinogènes indiquent que la majeure partie des souches *A. flavus* (90, 27 %) et *A. parasiticus* (92,53 %) sont fluorescentes sous lumière UV à la longueur d'onde de 365 nm (tableau 5). Cependant, aucune fluorescence n'a été détectée sous UV avec les souches *A. ochraceus* et *Aspergillus spp.* après huit (8) jours d'incubation. Cependant, ces souches peuvent produire d'autres types de métabolites secondaires dangereux. En effet, *Aspergillus ochraceus* est capable de produire dans certaines conditions de l'Acide Kojique, de l'Acide Neoaspergillique, de l'acide Penicillique, de l'Acide Sécalonique et de l'Ochratoxine A qui est également connue comme toxique (Tabuc, 2007).

Tableau 5. Potentiel aflatoxinogène des souches d'*Aspergillus* isolées

	Souches d' <i>Aspergillus</i> isolées de l'arachide			
	<i>A.flavus</i>	<i>A.parasiticus</i>	<i>A.ochraceus</i>	<i>Aspergillus spp.</i>

Nombre d'isolement des 86 échantillons	72	67	62	3
Nombre de souche ayant émis de fluorescence sous lumière UV	65	62	00	00
Pourcentage de souches aflatoxinogènes (%)	90,27	92,53	00	00
Pourcentage de souche non-aflatoxinogènes (%)	9,73	7,47	100	100
Ratio de souche toxigène / souche non-toxigène	9,27	12,38	00	00

Activités antifongiques des extraits végétaux : Les tests antifongiques ont révélé que tous les extraits de plantes utilisés possèdent une activité antifongique, dont l'intensité varie en fonction de l'espèce végétale, du type d'extrait (solvant utilisé) mais aussi de la souche fongique testée. En effet, les huiles essentielles et les extraits aqueux de *Ocimum gratissimum*, *Ocimum canum*, *Hyptis suaveolens*, *Ageratum conyzoides* et *Lantana camara*, ont exercé une activité antifongique prononcée sur les souches fongiques testées avec un Taux d'Inhibition (PI) de 100% qui s'est traduit par l'absence de croissance mycélienne sur les milieux de culture contenant ces différents extraits de plante (tableaux 6 et 7). L'activité antifongique prononcée de ces espèces végétales serait due à la composition chimique. En effet, les travaux de Alitonou (2006), Camara (2009), Kanko (2010), ont montré que l'activité antimicrobienne des HE d'O. *gratissimum* seraient due aux composés majoritaires tels que le

thymol, le γ -terpinène et le p-cymène. Les résultats de l'étude du pouvoir antiaflatoxinogène des extraits efficaces sur la croissance mycélienne des souches d'*Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* sont présentés dans le tableau 6. L'analyse de ces résultats montre une absence de fluorescence au niveau des deux souches mycéliennes après 7 jours de cultures sur le milieu Coconut Agar (CA) en présence des différents extraits d'*Ocimum gratissimum*, d'*Ocimum canum* et d'*Ageratum conyzoides*. Cependant, les deux souches mycéliennes cultivées en présence des extraits aqueux de *Hyptis suaveolens* et de *Lantana camara* sont fluorescentes sous l'UV. Cette fluorescence des souches indique une production d'aflatoxine. Ces résultats indiquent que l'extrait aqueux de *Hyptis suaveolens* et de *Lantana camara* sont peu actifs sur la production d'aflatoxine par les deux souches de moisissures dans la gamme de concentration testée.

Tableau 6. Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Fongicides (CMF) des huiles essentielles à activité antifongique prononcée

Plantes	<i>A. flavus</i>		<i>A. parasiticus</i>		<i>A. ochraceus</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CMF ($\mu\text{l/ml}$)	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CMF ($\mu\text{l/ml}$)	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CMF ($\mu\text{l/ml}$)	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CMF ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Ocimum gratissimum</i>	7,5 \pm 0,0 ^a	8,0 \pm 0,0 ^a	7,5 \pm 0,0 ^a	8,0 \pm 0,0 ^a	5,5 \pm 0,0 ^a	6,5 \pm 0,0 ^a	5,5 \pm 0,0 ^a	6,0 \pm 0,0 ^a
<i>Ocimum canum</i>	7,5 \pm 0,0 ^a	8,0 \pm 0,0 ^a	7,5 \pm 0,0 ^a	8,0 \pm 0,0 ^a	5,0 \pm 0,0 ^a	6,5 \pm 0,0 ^a	5,5 \pm 0,0 ^a	6,0 \pm 0,0 ^a
<i>Hyptis suaveolens</i>	20,0 \pm 0,0 ^b	25,0 \pm 0,0 ^b	20,0 \pm 0,0 ^b	25,0 \pm 0,0 ^b	15,0 \pm 0,0 ^b	20,0 \pm 0,0 ^b	15,0 \pm 0,0 ^b	20,0 \pm 0,0 ^b
<i>Ageratum conyzoides</i>	20,0 \pm 0,0 ^b	25,0 \pm 0,0 ^b	20,0 \pm 0,0 ^b	25,0 \pm 0,0 ^b	20,0 \pm 0,0 ^c	25,0 \pm 0,0 ^c	15,0 \pm 0,0 ^b	20,0 \pm 0,0 ^b
<i>Lantana camara</i>	15,0 \pm 0,0 ^c	20,0 \pm 0,0 ^c	15,0 \pm 0,0 ^c	20,0 \pm 0,0 ^b	10,0 \pm 0,0 ^d	15,0 \pm 0,0 ^d	10,0 \pm 0,0 ^c	15,0 \pm 0,0 ^c

Les valeurs sont des moyennes ($n= 3$) \pm SD. Les valeurs portant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$)

Tableau 7. Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) et Fongicides (CMF) des extraits aqueux à activité antifongique prononcée

Plantes	<i>A. flavus</i>		<i>A. parasiticus</i>		<i>A. ochraceus</i>		<i>F. oxysporum</i>	
	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CMF ($\mu\text{l/ml}$)	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CMF ($\mu\text{l/ml}$)	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CMF ($\mu\text{l/ml}$)	CMI ($\mu\text{l/ml}$)	CMF ($\mu\text{l/ml}$)
<i>Ocimum gratissimum</i>	50,0 \pm 0,0 ^a	75,0 \pm 0,0 ^a	50,0 \pm 0,0 ^a	75,0 \pm 0,0 ^a	50,0 \pm 0,0 ^a	75,0 \pm 0,0 ^a	50,0 \pm 0,0 ^a	75,0 \pm 0,0 ^a
<i>Ocimum canum</i>	50,0 \pm 0,0 ^a	75,0 \pm 0,0 ^a	50,0 \pm 0,0 ^a	75,0 \pm 0,0 ^a	50,0 \pm 0,0 ^a	75,0 \pm 0,0 ^a	50,0 \pm 0,0 ^a	75,0 \pm 0,0 ^a
<i>Ageratum conyzoides</i>	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b
<i>Hyptis suaveolens</i>	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b
<i>Lantana camara</i>	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b	100,0 \pm 0,0 ^b

Les valeurs sont des moyennes ($n= 3$) \pm SD. Les valeurs portant la même lettre dans la même colonne ne sont pas significativement différentes ($p < 0,05$)

Cette activité antiaflatoxinogène des huiles essentielles, traduite par l'absence de fluorescence au niveau des souches potentiellement toxigènes pourrait être due, soit à une réaction entre la mycotoxine (si elle était déjà produite) et l'huile essentielle qui formeraient un complexe non fluorescent sous UV ; ou à une inhibition de la production de la mycotoxine par la souche fongique en présence de l'huile essentielle, favorisée par l'aptitude de cette dernière à traverser la membrane plasmique. En effet, selon Conner et Beuchat (1984), l'activité des huiles essentielles résiderait non seulement dans leur aptitude à traverser la paroi cellulaire mais aussi serait liée à leur aptitude à endommager le système enzymatique cellulaire, y compris celui relatif à la production d'énergie. En effet, les travaux de Nogueira et al. (2010) sur l'évaluation en microscopie électronique des changements morphologiques au niveau d'une souche d'*Aspergillus flavus* cultivée en présence d'huile essentielle ont montré qu'en présence

de l'huile essentielle d'*A. conyzoides*, des changements pathologiques ont été observés au niveau du système endomembranaire, principalement la membrane plasmique et les organites membraneux, surtout les mitochondries. Billerbeck et al. (2001), après observations en microscopie électronique, ont également signalé l'amincissement des hyphes au niveau de *A. niger* cultivée en présence de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* (L.). Rasooli et Owlia (2005) ont également signalé des dommages irréversibles à la paroi cellulaire, la membrane cellulaire et des organites d'*Aspergillus parasiticus* cultivée en présence de deux espèces de Thymus. Rasooli et al. (2008) ont également rapporté des changements dans les membranes plasmiques et les mitochondries de *A. niger* cultivée en présence de l'huile essentielle de deux espèces de Thymus. Razzaghi-Abyaneh et al. (2008), ont également signalé des changements au niveau de la mitochondrie ainsi que la perturbation des membranes nucléaires et du réticulum endoplasmique.

CONCLUSION

Cette étude a permis de montrer l'efficacité des extraits de plantes dans la lutte contre la croissance et la production d'aflatoxine par les moisissures toxigènes contaminant l'arachide en post-récolte au Bénin. Ces

plantes pourraient alors constituer une alternative efficace en remplacement des antifongiques chimiques de synthèse qui sont parfois néfastes pour la santé du consommateur et pour l'environnement.

REMERCIEMENT

Les auteurs remercient le Département de Génie de Technologie Alimentaire de l'École Polytechnique de

l'Université d'Abomey-calavi (Bénin) pour son support financier dans la réalisation de ce travail

BIBLIOGRAPHIE

- Adjou ES, Yehouenou B, Sossou CM, Soumanou MM, de Souza CA, 2012. Occurrence of mycotoxins and associated mycoflora in peanut cake product (kulikuli) marketed in Benin. *African Journal of Biotechnology*, 11(78): 14354-14360.
- Alitonou GA, 2002. Composition chimique et activités antimicrobiennes des huiles essentielles de *Lantana camara* L. et d'*Eucalyptus tereticornis*. Mémoire de DEA. Faculté des Sciences et Techniques (FAST). Université d'Abomey calavi, 62p.
- Alitonou GA, 2006. Huiles essentielles extraites de plantes aromatiques acclimatées au Bénin : étude chimique, évaluation biologique et applications potentielles. Thèse de Doctorat en cotutelle, Université d'Abomey-Calavi et Université de Montpellier II, 176p.
- Atanda OO, Ogunrinu MC, and Olorunfemi FM, 2011. A neutral red desiccated coconut agar for rapid detection of aflatoxinogenic fungi and visual determination of aflatoxins. *World Mycotoxin Journal*, 4 (2): 147-155.
- Bankole S, Mabekoje OO, 2004. Mycoflora and occurrence of aflatoxin B1 in dried yam chips from markets in Ogun and Oyo States, Nigeria. *Mycopathologia*, 157: 111-115.
- Billerbeck VG, Roques CG, Bessière JM, Fonvieille JL, Dargent R, 2001. Effect of *Cymbopogon nardus* (L) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Canadian Journal of Microbiology*, 47: 9-17.
- Camara A., 2009. Lutte contre *Sitophilus oryzae* L. (Coléoptère) et *Tribolium Castaneum* herbst dans les stocks de riz par la technique d'étuvage traditionnelle pratiquée en Basse-Guinée et l'utilisation des Huiles Essentielles végétales : Thèse de Doctorat en Sciences de l'Environnement. Université du Québec à Montréal, 114p.
- Conner DE, Beuchat LR, 1984. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage. *Yeast. Journal of Food Science*, 49: 429-434.
- Couthon JD, 2008. Effet des extraits de *Ocimum gratissimum* (Lamiaceae) sur des souches

- cliniques de *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli*. Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Études Approfondies. Université d'Abomey-Calavi. 67p.
- FAOSTAT (2011). Production data. Available online at: <http://faostat.fao.org>.
- Filtenborg O, Frisvad JC, Thrane U, 1995. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology*, 33:85–102.
- Food and Agriculture Organization (1998): The State of Food Insecurity in the World. Rome: FAO.
- Godjo T, Singbo A, Dakin E, 2002. Essai d'adaption de l'extracteur motorisé d'huile d'arachide. Actes de l'atelier scientifique post-récolte. *Bohicon, les 26 et 27 juillet 2001*.
- Hammer KA, Carson CF, Ridley CV, 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plants extract. *Journal of Applied Microbiology*, 86:985-990.
- Hammer KA, Carson CF, Ridley CV, 2003. Antifungal activity of components of *Meulaleuca alternifolia* (tea tree) oils. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 853-860.
- Hidalgo E, Moore D, Le Patourel G, 1998. The effect of different formulations of *Beauveria bassiana* on *Sitophilus zeamais*. *Journal of Stored Products Research*, 34, 171–179.
- IARC (1993). Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic amines and mycotoxins. IARC monographs on evaluation of carcinogenic risk to humans. International Agency for Research on Cancer 56, Lyon, France.
- Illiassa N, 2004. Analyse de la gestion post-récolte de *Vigna unguiculata* (WALP) et évaluation de l'importance insecticide des huiles essentielles de trois plantes aromatiques. Mémoire de maîtrise en Biologie Animale, Faculté des Sciences, Université de Ngaoundéré, Cameroun.
- Khallil ARM, 2001. Phytofungitoxic properties in the aqueous extracts of some plants. *Pakistan Journal of Biological Science*, 4(4):392–394.
- Kanko C, 2010. Contribution à l'étude phytochimique de plantes médicinales et aromatiques de Côte d'Ivoire. Activités analgésique et anti-inflammatoire de stérols isolés de l'écorce de *Parkia biglobosa* (Mimosaceae). Thèse de doctorat en Sciences Physiques. Université de Cocody-Abidjan, 187p.
- Mishra AK, Dubey NK, 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(4), 1101-1105.
- Moosavy MH, Basti AA, Ali M, 2008. Effect of *Zataria multiflora* Boiss. essential oil and nisin on *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus* in a food model system and on the bacterial. *International Journal of Food Microbiology*, 43, 69–76.
- Nesci A, Montemarani A, Etcheverry M, 2011. Assessment of mycoflora and infestation of insects, vector of Aspergillus section Flavi, in stored peanut from Argentina. *Mycotoxin Research*, 27:5–12
- N'guyen M, 2007. Identification des espèces de moisissures potentiellement productrices de mycotoxines dans le riz commercialisé dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam – Étude des conditions pouvant induire la production de mycotoxines. Institut National Polytechnique de Toulouse (INPT). Thèse de doctorat. 147 p.
- Nogueira JHC, Gonçalves E, Galletti S R, Facanali R, Marques MOM, Felício JD, 2010. Ageratum conyzoides essential oil as aflatoxin suppressor of *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology* 137: 55–60.
- Noudogbessi J-P, 2006. Étude chimique et activité des huiles essentielles extraites des feuilles de *Pimenta racemosa* (Miller) et de *Chromolaena odorata* (L. Robinson) récoltées au Bénin sur *Prosthephanus truncatus* Horn. Mémoire pour l'obtention du Diplôme d'Études Approfondies. Faculté des Sciences et Technique, Université d'Abomey-calavi. 67p.
- Pitt JI, Hocking AD, Bhudhasamai K, Miscamble BF, Wheeler KA, Tanboon EKP, 1994. The normal mycoflora of commodities from Thailand. 2: Beans, rice, small grains and other commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 23: 35– 53.
- Rasoli I, Owlia P, 2005. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. *Phytochemistry*, 66: 2851-2856.
- Rasoli I, Fakoor MH, Yadegarinia D, Gachkar L, Allameh A, Rezaei MB, 2008. Antimycotoxigenic characteristics of *Rosmarinus officinalis* and *Trachyspermum copticum* L. essential oils. *International Journal of Food Microbiology*. 122: 135-139.
- Razzaghi-Abyaneh M, Shams-Ghahfarokhi M, Yoshinari T, Rezaee MB, Jaimand K, Nagasawa H, Sakuda S, 2008. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *International Journal of Food Microbiology*, 123: 228-233.

- Ruppel P, Delfosse P, Hornick J, 2004. La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. *Annales de Médecine Vétérinaire*, 2 148 : 141-146.
- Sharma N, Verma UK, Tripathi A, 2004. Bioactivity of essential oil from *Hyptis suaveolens* against storage. Conférence on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products, Gold-Coast Australia. 8-13th, August 2004. FTIC Ltd. Publishing, Israel. pp. 99-116.
- Singh K, Frisvad JC, Thrane U, Mathu SB, 1991. An illustrated manual on identification of some seed borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and their mycotoxins. Danish Government, Institute of seed pathology for developing countries, Hellerup, Denmark.
- Sultan Y, Magan N, 2010. Mycotoxigenic fungi in peanuts from different geographic regions of Egypt. *Mycotoxin Research*, 26:133-140
- Tabuc C, 2007. Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse et Université de Bucarest.
- Tonzibo ZF, Brou Affia F, Bédi G, Chalchat JC, 2009. Chemical Composition of Essential Oil of *Hyptis Suaveolensis* (L) Poit. from Côte d'Ivoire . *European Journal of Scientific Research*, 38 (4):565-571.
- Tatsadjieu N, Jazet M, Ngassoum MB, Etoa X, Mbofung MF, 2010. Investigations on the essential oil of *Lippia rugosa* from Cameroon for its potential use as antifungal agent against *Aspergillus flavus* Link ex. Fries. *Food Control*, 5:161-166.
- Yèhouéno B, Noudogbessi J-P, Sessou P, Avlessi F, Sohounhloué Dominique, 2010. Étude chimique et activités antimicrobiennes d'extraits volatils des feuilles et fruits de *Xylopiæ aethiopiæ* (Dunal) A. Rich. Contre les pathogènes des denrées alimentaires. *Journal de la Société Ouest-Africaine de Chimie*, 029 : 19 - 27.
- Yehouenou B, Ahoussi E, Sessou P, Alitonou GA, Toukourou F, Sohounhloué CKD, 2012. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils (EO) extracted from leaves of *Lippia rugosa* A. Chev against foods pathogenic and adulterated microorganisms. *African Journal of Microbiological Research*, 6(26):5496-5505.