

**UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA**  
**Faculté Des Sciences De La Nature Et De La Vie**  
**Département Des Sciences Biologiques**



**Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de**

**MASTER ACADEMIQUE**

**Domaine: Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Biologie**

**Spécialité : Biotechnologie végétale**

**Présenté par : M<sup>lle</sup> Berrached Imane**

**Thème**

**Contribution d'étude de l'effet de L'extrait aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad sur la croissance des champignons des céréales**

Soutenu publiquement

Le : 31/05/2016

Devant le jury

Dr.Slimani Nour el edin.	MC(B)	Présidente	UKM Ouargla
Dr. Bensizerara Djamel.	MC(B)	Examinateur	UKM Ouargla
Dr. Salhi Nesrine.	MC(A)	Promotrice	UKM Ouargla

**Année universitaire : 2015/2016**

# Remerciements

*Tous nos remerciements vont d'abord à notre DIEU le tout puissant, pour nous avoir donnée la force et la patience*

*Ce travail a été entièrement réalisé au laboratoire de Bioressources sahariennes:*

*Préservation et valorisation de université KASDI MERBAH Ouargla. Nombreux sont ceux qui*

*ont contribué d'une façon ou d'un autre à l'aboutissement de ce travail. Nous remercions*

*particulière à: Mme Kaci Safia, Dr Boual Zakaria, Pr Mensous, Pr Ben Saci, Mme ben brahim. pour nous avoir accueilli dans leur laboratoire, guidés et encouragés*

*scientifiquement tout au long de ce travail, nous les remercions vivement pour*

*leur soutien, leurs conseils précieux et leur critique qui nous aident au sein du laboratoire.*

*Notre remerciement va à notre encadreur Dr: SALHI NESRINE pour avoir accepté de diriger ce travail, qu'elle trouve ici, l'expression de notre profonde*

*reconnaissance, notre immense gratitude et notre grand respect, pour tous ses efforts, son savoir, ses idées, sa confiance ses encouragements.*

*Il ne nous serait pas possible de présenter ce mémoire sans témoigner de notre profonde gratitude à notre Co-promoteur Rahmani baha eddin pour son aide scientifique et de ses conseils.*

*nous avoir fait l'honneur d'être Examineur et de participer au*

*jury de ce mémoire avec Dr. Bensizerara djamel et DR, Slimani Nour eddin*

*Nous sommes agréables d'exprimer notre remerciement à tout notre ami et nos collègues qui nous ont aidés pour le bon achèvement de ce travail.*



## *Dédicaces*

*Que ce travail témoigne de mes respects :*

*A mes parents : Grâce à leurs tendres encouragements et leurs grands sacrifices, ils ont pu créer le climat affectueux et propice à la poursuite de mes études.*

*Aucune dédicace ne pourrait exprimer mon respect, ma considération et mes profonds sentiments envers eux.*

*Je prie le bon Dieu de les bénir, de veiller sur eux, en espérant qu'ils seront toujours fiers de moi.*

*A ma sœur et à mon frère.*

*A la famille Berrached et Ben abdessadok,*

*Ils vont trouver ici l'expression de mes sentiments de respect et de reconnaissance pour le soutien qu'ils n'ont cessé de me porter.*

*A tous mes professeurs : Leur générosité et leur soutien m'oblige de leurs témoigner mon profond respect et ma loyale considération.*

*A tous mes amis et mes collègues surtout : Nour ,SAmiha ,zineb ,madiha ,lilia,rabi3a,Hassiba,kamel, Adnan Ils vont trouver ici le témoignage d'une fidélité et d'une amitié infinie.*

*Berrached imen*

# Sommaire

---

Remercîment

Dédicace

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des photos

Introduction ..... 1

## *Chapitre I : Matériels et méthodes*

<b>I-1- Matériel végétal</b> .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I-1-1- <i>citrullus Colocynthis</i> (L.) Shard.....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
I-1-2 -Les céréales .....	5
I-1-2-1 –Les graines de <i>triticum durum</i> Var simeto .....	5
I-1-2-2- Les graines de <i>Hordeum vulgare</i> Var Saida 183 .....	5
I-1-2-3- Les graines de <i>triticum aestivum</i> Var HD 1220.....	6
<b>I-2- Méthodologie</b> .....	7
I-2-1 -Préparation du milieu de culture .....	7
I-2-2 -Isolement et purification de la mycoflore de stockage .....	7
I-2-3- Identification des champignons.....	8
I-2-3-1 Identification des genres .....	8
I-2-3-2- Identification des espèces .....	8
<b>I-3- Préparation de l'extrait aqueux</b> .....	10
I-3-1- Echantillonnage.....	10
I-3-2- Séchage .....	10
I-3-3 –Broyage .....	10
I-3-4 -Préparation des extraits aqueux.....	10
<b>I-4 les tests antifongiques</b> .....	12
I-4-1-préparation de milieu .....	12
I-4-2-préparation des différentes concentrations d'extrait aqueux.....	13
I-4-3-Essai d'activité antifongique .....	13
<b>I-5- Expression des résultats</b> .....	15
I-5-1-La cinétique de croissance mycélienne .....	15
I-5-2-La croissance mycélienne .....	15
I-5-3-Détermination de l'indice antifongique .....	15

# Sommaire

---

I-5-4-Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC).....	15
I-5-5-Observations microscopiques .....	16
<b>I-6- test phytochimiques .....</b>	<b>16</b>
I-6-1 Détection des polyphénols.....	16
I-6-1-1 Détection des tanins .....	16
I-6-1-2 Détection des anthocyanes .....	16
I-5-1-3 Détection des flavonoïdes .....	16
I-6-2 Détection des Saponosides .....	18
I-6-3 -Détection des alcaloïdes.....	18
I-6-4 Détection des terpènes.....	19
I-6-4-1 Détection des stéroïdes.....	19
<b>I-7- Analyse statistique .....</b>	<b>20</b>

## *Chapitre II : Résultats et discussion*

<b>II-1 Résultats .....</b>	<b>22</b>
II-1-1 Isolement et purification .....	22
II-1-2 Identification des isolats fongiques.....	22
II-1-2-1 Identification de genre .....	22
II-1-2-2 Identification des espèces par la méthode de (Single spore) .....	25
II-1-3 Tests phytochimiques des extraits aqueux des graines <i>Citrullus Colocynthis</i> ... 28	
II-1-4 Etude de l'effet de l'extrait aqueux de <i>Citrullus Colocynthis</i> (Eq CC) sur les trois souches isolées .....	29
II-1-4-1-Effet de l'extrait aqueux sur la cinétique de croissance .....	29
II-1-4-2-Effet de l'extrait aqueux de <i>Citrullus Colocynthis</i> sur la croissance mycélienne.....	30
II-1-4-3-Effet de l'extrait aqueux de <i>Citrullus Colocynthis</i> sur la vitesse de la croissance mycélienne .....	32
II-1-4-4-Indice antifongique .....	33
II-1-5-Observation Microscopiques .....	33
II-6-Discussion.....	37
<b>Conclusion.....</b>	<b>39</b>
<b>Références bibliographiques</b>	
<b>Annexes</b>	
<b>Résumé</b>	

## Liste des tableaux

<b>Tableau</b>	<b>Texte</b>	<b>Page n°</b>
<b>01</b>	Représente les différentes concentrations d'extraits aqueux.	<b>13</b>
<b>02</b>	Identification des espèces d' <i>aspergillus</i> et <i>penicillium</i> par la méthode de Single Spore.	<b>26</b>
<b>03</b>	Identification des espèces d' <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> dans différents milieux par la méthode de Single Spore.	<b>27</b>
<b>04</b>	Tests phytochimiques effectués sur l'extrait aqueux des graines de <i>Citrullus Colcoynthis</i> .	<b>28</b>
<b>05</b>	Observation Microscopique des souches testées.	<b>35</b>

## Liste des figures

Figure	Texte	Page n°
01	Type d'inoculation des différents isolats	9
02	L'extraction aqueux à partir des graines de <i>Citrullus Colocynthis</i> .	11
03	Préparation de milieu du test antifongique	12
04	Diagramme expérimentale de l'essai d'activité antifongique de l'extrait aqueux	14
05	tests phytochimiques pour la détection des polyphénols	17
06	test phytochimiques pour la détection des Saponosides.	18
07	test phytochimiques pour la détection des alcaloïdes.	19
08	test phytochimiques pour la détection des Stéroïdes.	20
09	Croissance mycélienne (mm) d' <i>Aspergillus flavus</i> , <i>penicillium digitatum</i> , <i>Aspergillus orchaceus</i> en fonction du temps d'incubation et de la concentration de l'extrait aqueux de citrullus	29
10	Effet des différentes concentrations de l'extrait aqueux sur les souches fongiques.	31
11	La vitesse de la croissance mycélienne du <i>l'Aspergillus Flavus</i> , <i>Penicillium digitatum</i> et <i>l'Aspergillus ochraceus</i> sous l'effet de l'extrait aqueux.	32
12	Indice antifongique d'inhibition de la croissance mycélienne de <i>A.flavus</i> , <i>A.orchaceus</i> , <i>P.digitatum</i> de la concentration en extrait aqueux de <i>citrullus colocynthis</i> .	33

## Liste des photos

<b>Photo</b>	<b>Texte</b>	<b>Page n°</b>
<b>01</b>	<i>Citrulus colocynthis.</i>	<b>4</b>
<b>02</b>	Les graines de <i>Triticum durum.</i>	<b>5</b>
<b>03</b>	Les graines de <i>Hordeum vulgare.</i>	<b>5</b>
<b>04</b>	Les graines de <i>Triticum aestivum.</i>	<b>6</b>
<b>05</b>	Méthode de micro culture.	<b>8</b>
<b>06</b>	les souches fongiques à partir les grains de céréales	<b>22</b>
<b>07</b>	Caractères macroscopique et microscopique de la souche BDS isolées.	<b>23</b>
<b>08</b>	Caractères macroscopique et microscopique de la souche SBT isolées.	<b>23</b>
<b>09</b>	Caractères macroscopique et microscopique de la souche SOR isolées.	<b>24</b>





# Introduction

# Introduction

---

## **Introduction :**

Les grains de céréales constituent depuis toujours la principale ressource alimentaire de l'homme et des animaux domestiques; c'est pourquoi la connaissance des phénomènes relatifs à leur conservation et la maîtrise des techniques de leur stockage sont déterminantes pour l'environnement, la protection des ressources animales et surtout la survie de millions de personnes. **(Multon, 1982; Molinié et Pfohl-Leszhowicz, 2003).**

En Algérie, les produits céréaliers occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale. Cette caractéristique est perçue d'une manière claire à travers toutes les phases de la filière **(Djermoun, 2009).**

La superficie emblavée annuellement se situe 2708 880 d'ha et la production céréalière s'est établie à 49 109 735 Qx, Dans la région d'Ouargla occupe une superficie annuellement récoltées représentent 307 d'ha avec une production de 5996 Qx **(CCLS, 2014).**

Les céréales sont des produits stockés à long terme et présentent une facilité pendant leur transport **(Doumandji et tiL, 2003).**

Ces grains sont disponibles au marché pendant toute l'année et la conservation est pratiquée pendant de longues périodes dans les grands silos. Cette modernisation si elle n'est pas bien étudiée, peut aboutir à de grands problèmes **(Multon, 1992).**

L'infection par les microorganismes représente l'une des causes majeures d'altération des grains et des graines stockés, et leur importance est encore trop souvent sous-estimée.

Les moisissures du stockage, peuvent amener à toute une série d'altérations, entraînant des pertes sur les plans technologiques, commercial, hygiénique et nutritionnel : simple défaut d'aspect, pertes de matière sèche, certains champignons armés de puissants systèmes enzymatiques leur permettent de modifier le substrat aux dépens duquel ils se développent, modifier la valeur nutritionnelle des aliments, ralentir la croissance des animaux liée au développement de moisissures dans leurs aliments, altérer les qualités organoleptiques, détruire les acides gras essentiels et diminuer le pouvoir germinatif... **(Multon, 1992).**

Face à cette contamination, des produits chimiques ont été employés pour empêcher la croissance fongique **(Phattayakorn et Wanchaitanawong, 2009).** Cependant, l'OMS interdit

## Introduction

---

l'usage de certains fongicides chimiques, en raison de leurs effets toxicologiques indésirables à long terme, y compris la cancérogénicité (**Chahardehi et al., 2010**). De même, l'augmentation de la conscience du consommateur au sujet des risques de ces composés sur les produits alimentaires a incité la nécessité de rechercher d'autres agents de conservation, efficaces, naturels et sans danger pour la santé.

Il existe de nombreuses méthodes de protection des produits locaux stockés. Les méthodes traditionnelles, telles que l'utilisation de certains matériaux naturels (plantes, minéraux, huile), sont toujours très efficaces. (**Wageningen, 2004**)

A l'heure actuelle, Les plantes sont également utilisées pour leur propriété antibactérienne et antifongique. Cependant, en tant que sources de médicaments, les plantes restent encore sous exploitées surtout dans le domaine de la microbiologie médicale. Un grand nombre de ses composés sont de très bons agents antifongiques. Les études in vitro ont démontré que les substances bioactives provenant de diverses espèces végétales à intérêt médicinales présentent un spectre large d'activité sur une gamme de flore fongique dont inclus les champignons toxigènes (**Mohammedi, 2013**).

Il y a environ 500 000 plantes sur terre ; 10 000 d'entre elles environ, possèdent des propriétés médicinales (**ISERIN et al., 2001**). **Hamidi (2013)** à exprime que les métabolites secondaires dans toutes les parties de plantes, mais ils sont distribués différemment selon leurs rôles. Cette distribution varie d'une plante à l'autre.

Ces métabolites sont des molécules organiques complexes synthétisées et accumulées en petites quantités par les plantes autotrophes, ils sont divisés principalement en trois grandes familles: Les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (**Boudjouref, 2011**).

De nombreux travaux indiquent l'apparition des résistances des moisissures vis-à-vis des substances chimiques. Ces substances causent à la fois des problèmes toxicologiques et écologiques. L'utilisation des plantes médicinales dans la cuisson et l'assaisonnement; Comme une source très importante pour de nombreuses substances à activités antimicrobiennes (exemple: l'extrait aqueux).

Les principaux objectifs de ce travail consistent à isoler et à identifier les moisissures contaminant les grains de trois espèces de céréales (le blé dur, blé tendre et l'orge), et à mettre

## Introduction

---

en évidence les activités antifongiques de L`extrait aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad vis-à-vis des souches isolées.



# Matériels et méthodes



**Chapitre I : Matériels et méthodes.**

L'objectif de notre travail pour déterminer le pouvoir antifongique de diverses concentrations d'extraits aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance des champignons de stockage des céréales a savoir Blé dure ( *Triticum durum var semito* ), Blé tendre ( *Triticum aestivum var HD1220* ) et L'orge ( *Hordeum vulgare var saida* ).

**I-1 Matériel végétal :****I-1-1 *Citrullus colocynthis* (L) Schrad.:**

Le genre *Citrullus* est une plante vivace à longues tiges rampantes s'étalant sur le sol pouvant dépasser 1 m de long elle est entièrement hérissée de poils raides. ses feuilles est grandes alternes, découpées, vert vif et portant des vrilles à leur aisselle. Les Fleurs est composées de cinq pétales jaune clair. Ses fruits sphériques et lisses ressemblant à des petites pastèques, Colorées de vert foncé ou de jaune selon la maturité (Chehma., 2006).

**Habitat :** rencontrée sur les terrains sablonneux et sablo-argileux des lits d'oued et dépressions. **Répartition :** très commun dans tout le Sahara. **Pharmacopée :** Elle est utilisée, en infusion, cataplasme, pommade et compresse pour les traitements de piqûres de scorpion, indigestions, dermatoses et infections génitales. Elle est également utilisée pour soigner les dermatoses des dromadaires

**Systematique :**

**Règne :** *Plantae*

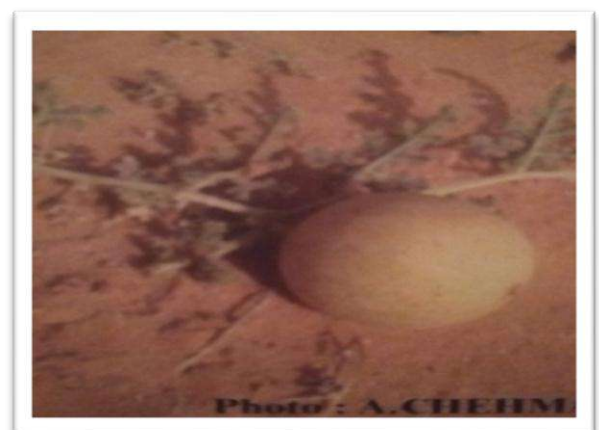
**Ordre :** *Violales*

**Famille :** *Cucurbitaceae*

**Division :** *Magnoliophyta*

**Classe :** *Magnoliopsida*

**Genre :** *Citrullus* (élec).



**Photo 01: *Citrullus colocynthis* (L)Schrad.(Chehma .,2006)**

**I-1-2 Les Céréales :**

L'étude expérimentale concernée les graines de trois variétés : une variété de ble tendre (*Triticum aestivum* variété HD1220), une variété blé dur (*Triticum durum* variété SIMETO), et une variété d'orge (*Hordeum vulgare* variété SAIDA. ) : Provient de l'Office Interprofessionnelle des Céréales (OAIC) et avec précision de la CCLS (Coopérative de Céréales et de Légumes Secs).

**I-1-2-1 Blé dur, (*Triticum durum* var Simeto )**

C'est une variété qui nommée aussi (Sersou), l'origine de cette variété en Italie, leurs rendement est élevé, qui caractérise par un PMG élevé d'une qualité très bonne et une mitadinage résistante, la teneur en protéines de 15,80%, cette variété résistent aux maladies.

Les graines est caractérisée par :

- De formes demies allongées
- La longueur des poils de la brosse vue dorsale moyenne
- Coloration au phénol faible
- Le type de développement en hiver. (CCLS .,2009)



**Photo02** : les graines de *Triticum durum*

**I-1-2-2 L'orge (*Hordeum vulgare* var Saida 183 ) :**

C'est une variété qui nommée (Saida183), l'origine de cette variété en Algérie, leurs rendement est élevé, qui caractérise par un PMG élevé, tandis que la teneur en protéines de 14,85%, cette variété résistent aux maladies.

**Caractéristiques de La graine :**

- Le type de pilosité de la baguette courte
- Les glumelles sont présentes



**Photo03** : les grains de *Hordeum vulgare*

- La pigmentation anthocyanique des nervures de la glumelle inférieure nulle à très faible
- La denticulation des nervures de la glumelle inférieure nulle à très faible
- La pilosité du sillon est absente
- La position des lodicules se forme latérale.(CCLS.,2009)

### **1-2-3- blé tendre (*Triticum aestivum* var HD1220) :**

La variété de blé tendre “Neelkant” appelée Hidhab ou HD 1220, elle présente un pouvoir germinatif de 88 % et un poids de mille graines (PMG) de 37,05 grammes **M.Amara et al .,(2014)**

#### **Caractéristique de la graine :**

- La graine est d'une couleur roux d'une forme demi allongée.



**Photo04** : les graines de *Triticum aestivum*

**I-2. Méthodologie :****I-2-1 Préparation milieu de culture :**

Pour isolée les champignons, nous avons utilisé le PDA (Potato Dextrose Agar)(SINGH et al., 2006; CHENG et al., 2006; BAJPAI et KANG, 2010) qui contient :

**Pomme de terre solide 200g/l.**

**Glucose 20g/l.**

**Agar 15g/l.**

**PH 5.6±0,2.**

Pour préparé le milieu PDA on chauffe la solution de 700ml d'eau distillé et 200g des Amorce de pomme de terre solide pendant 20min, ensuite on fait la filtration. On récupère la solution filtrée et mélanger avec 20g de glucose et 15g d'agar puis on ajoute l'eau distillé jusqu'à l'obtention de 1litre au niveau de bloque chauffant agitateur jusqu'à la gélification de milieu. Stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 15min.

**1-2-2 Isolement et purification de la mycoflore de stockage :**

Pour isoler des champignons des graines de blé dur, blé tendre et l'orge, on a mis dans l'eau de javel à concentration 10% pendant 5 minutes. Les échantillons sont ensuite rincés avec de l'eau distillée pendant 2min trois fois successives, le séchage s'effectue sur papier filtre stérile (BELYAGOUBI (2005 et 2006).

La mis en culture s'effectue juste après sur le milieu du PDA dans des boites pétrie et l'incubation se fait dans l'étuve à 25° C pendant 7 jours, Après l'incubation les souches fongiques ont repris leurs croissance, avec l'obtention dans chaque boites de pétrie d'un groupe hétérogène de colonies. Un repiquage successif est alors réalisé pour purification complète où l'on trouve dans chaque boite de pétrie une espèce donnée (Botton et al., 1999).

### I-2-3 Identification des champignons :

L'identification des genres et espèces des champignons qui en purifier se fait essentiellement appel aux caractères cultureux et à la morphologie (**Botton et al ., 1990**). Par la technique de micro culture (photo 05).

La technique de micro-culture consiste à inoculer les spores des moisissures sur une lame menée de petits carrés, de milieu PDA acidifié et les recouvrir par une lamelle. L'ensemble est conditionné dans une chambre stérile et humide puis incubé  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  pendant 3 à 5 jours. (**Haris., 1989**).

#### I-2-3-1 Identification des genres :

Après incubation, les lamelles auxquelles s'adhèrent le mycélium sont transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements  $\times 10$ ,  $\times 40$  et  $\times 100$ . Les genres sont déterminés par les caractères cultureux et microscopiques en se référant au manuel de (**Barnett ,1972**).



**Photo 05 : Méthode de micro culture, d'après (Chabasse et al., 2002)**

#### I- 2-3-2 Identification des espèces :

L'identification des espèces est réalisée par la méthode de **Pitt 1973** et **Ramirez 1982**. Cette méthode est dite « Single Spore », basée sur la relation entre l'activité de l'eau du milieu de



culture et la température d'incubation. Elle consiste en l'inoculation de quelques spores d'une culture jeune dans des tubes à hémolyse contenant une suspension semi solide à base de 0,2% d'Agar et quelques gouttes de Tween 80.

Elle se fait sur trois milieux différents qui sont :

- **Malt Extract Agar (M.E.A) à 25 C° :**

Matière sèche (50g )

Agar (5g).

Eau distillée (1000g).

- **Glycérol Nitrate Agar (G25N) à 25C° :**

Sucrose (40g).

Extrait de levure (20g).

Eau distillée (1000ml).

- **Czapek Yeast Agar ( C.Y.A ) à deux températures différentes : 5 C° et 37 C° .**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1g).

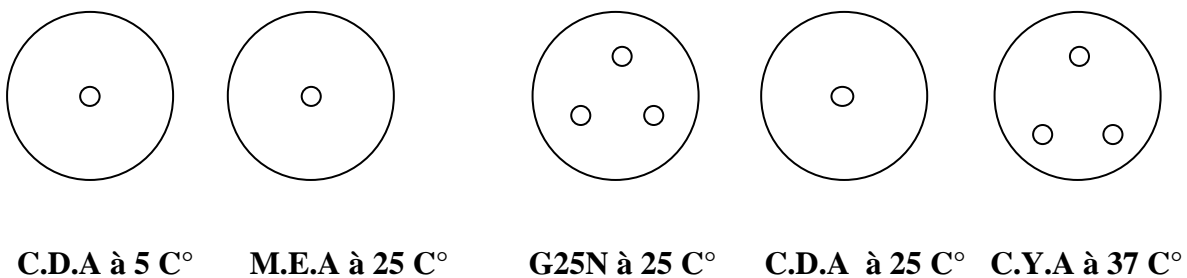
Extrait de levure (5g).

Sucrose (3g).

Agar (15g).

Eau distillée (1000ml).

Ces milieux sont inoculés comme le montre la figure suivante :



**Figure 01** : Type d'inoculation des différents isolats

**I-3 Préparation de l'extrait aqueux :****I-3-1 Echantillonnage :**

Les graines de *Citrulus colocynthis* (.L)Schrad. Proviennent de la région de Ain amenas situé à environ 800km de la ville de ouargla.

**I-3-2 Séchage :**

Les graines est séché à l'air libre pendant trois semaines, à l'abri de la chaleur et de la lumière pour éviter l'oxydation.

**I-3-3 Broyage :**

Les graines de fruit ont été concassées dans un mortier traditionnel, la poudre obtenue a été conservée dans des récipients jusqu'à l'utilisation.

**I-3-4 L'extraits aqueux :**

20 g de la poudre végétale additionnés de 100 ml d'eau distillée (20% W/V), sont mis en agitation (200 rpm /min) pendant 4h à une température de 25°C (**Razak et al, 2009**). Le mélange est ensuite centrifugé à 3600 t/min pendant 15min. Le surnagent est récupéré puis filtré sur papier filtre Wattman. Cette opération est répétée trois fois. A la fin l'extrait a été stérilisé à l'aide des micro filtres (0,2 Um) et le filtrat stérile récupéré dans un flacon stérile et conservé à 4c°, à l'abri de la lumière jusqu'au moment de son utilisation.

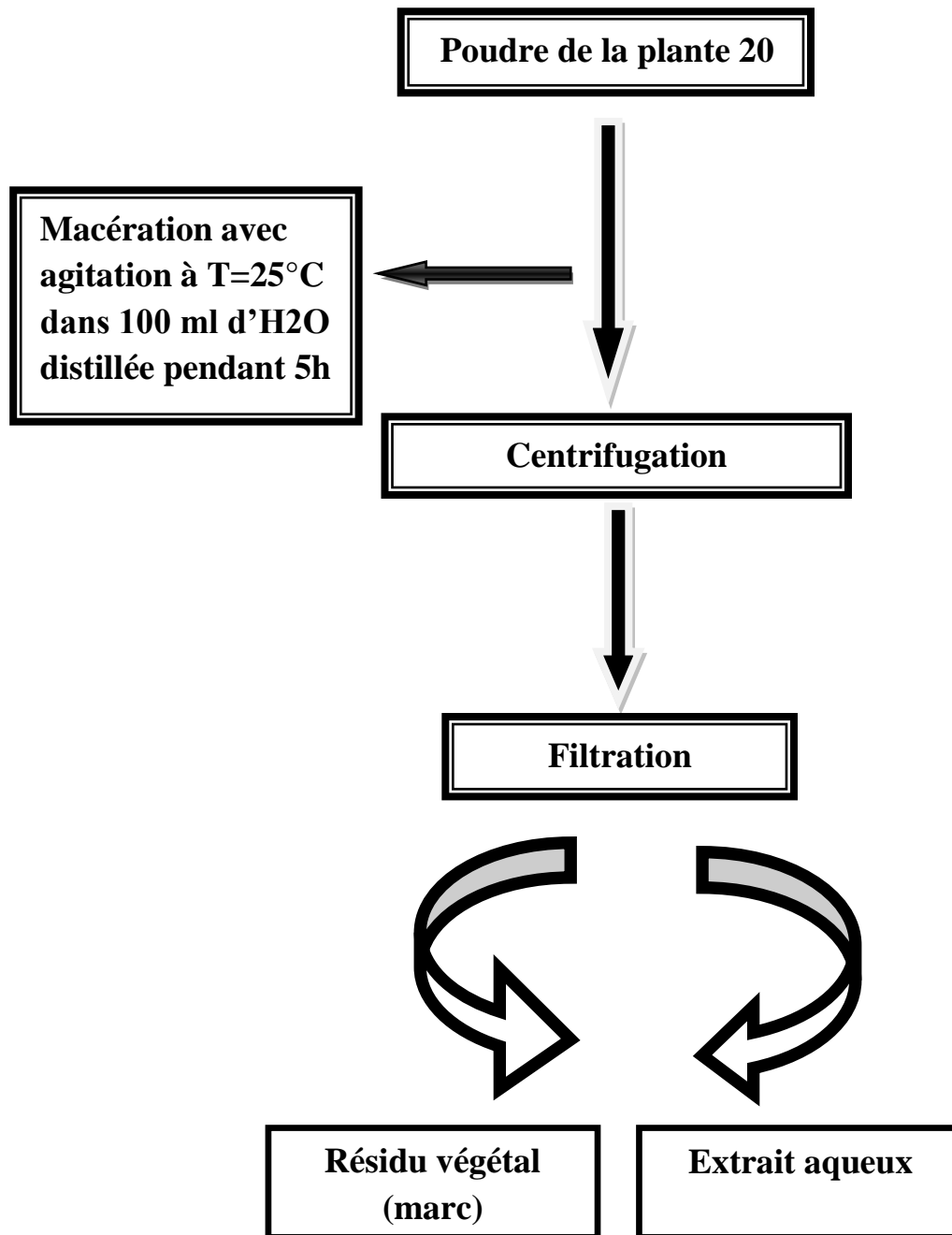


Figure 02 : l'extraction aqueux à partir des graines de *Citrullus Colocynthis*

#### I-4 Les tests Antifongiques :

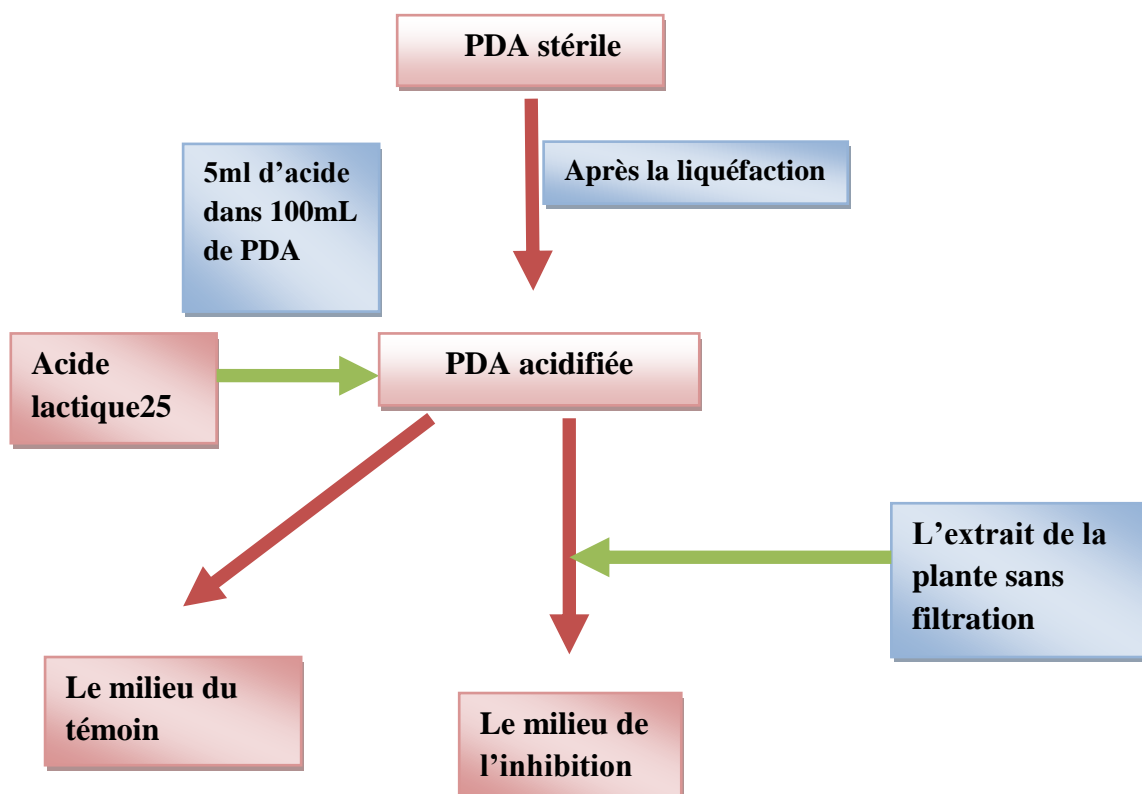
Pour effectuer le test antifongique, nous avons adopté la méthode de contact direct. Ce Test est réalisé au niveau du laboratoire pédagogique de microbiologie.

##### I-4-1 Préparation de milieu :

- Pour cette étape a utilisé le PDA acidifié par l'acide lactique par ce que les moisissures peuvent métaboliser l'acide lactique mais les bactéries et les levures vont être inhibés.

- Après la préparation et la stérilisation du PDA on va ajouté de l'acide lactique 25% en raison de 5ml par 100ml de PDA (tu peut allé jusqu'à 2ml par 100ml de PDA), si on ajoute de l'acide avant la stérilisation; l'agar-agar va se dégradé et le milieu ne va pas se solidifiée.

Puis on mélange notre PDA acidifiée avec l'extrait de la plante (non stérile) avec des concentrations déterminée. (Figure 03)



**Figure 03 :** Préparation de milieu du test antifongique

**I-4-2- Préparation des différentes concentrations d'extraits aqueux :**

Nous avons préparé 06 concentrations d'extraits aqueux (Eq) ajustées à l'aide de PDA,

Comme suit (Tableau 01) :

**Tableau 01** : les différentes concentrations d'extraits aqueux

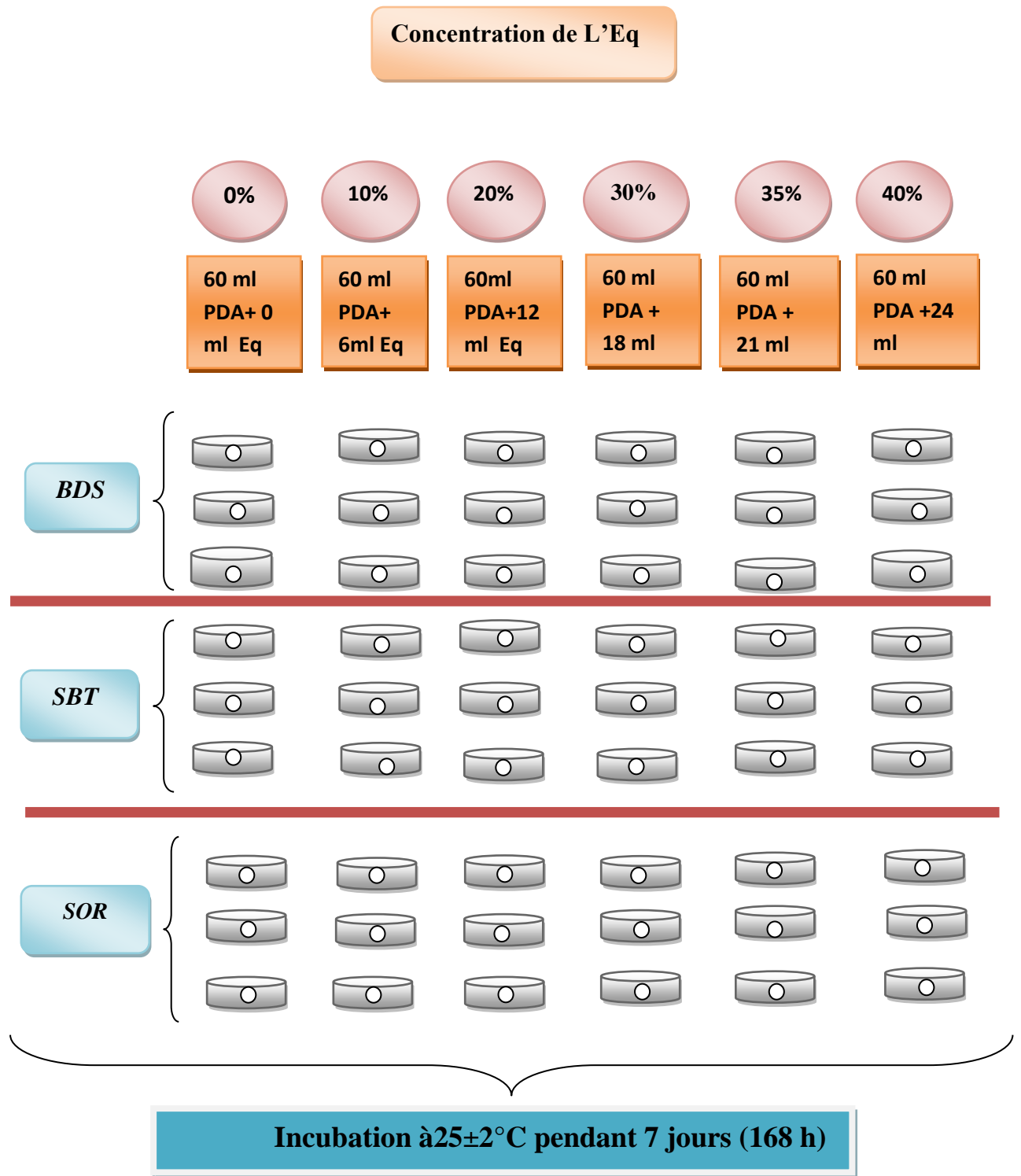
<b>Concentration 1 (0%)</b>	<b>0ml Eq + 60 ml PDA</b>
<b>Concentration 2 (10%)</b>	<b>6ml Eq + 60 ml PDA</b>
<b>Concentration 3 (20%)</b>	<b>12ml Eq + 60 ml PDA</b>
<b>Concentration 4 (30%)</b>	<b>18ml Eq + 60 ml PDA</b>
<b>Concentration 5 (35%)</b>	<b>21ml Eq +60 ml PDA</b>
<b>Concentration 6 (40%)</b>	<b>24 ml Eq+60 ml PDA</b>

Les mélanges sont ensuite agités durant quelques minutes en vue de leur homogénéisation.

**I-4-3- Essai d'activité antifongique :**

Dans des conditions stériles, 10 ml de mélange (PDA stérilisé+ Eq), ont été coulés dans des boîtes de Pétri (diamètre 60 mm). Après refroidissement et solidification de ce mélange sur la paillasse, on utilise des hypodermes stériles qui contiennent une suspension semi solide de 0,2% d'agar et quelque goutte de tween 80 et inoculée de quelques spores d'une culture jeune. Ont été prélevés une goutte et inoculés au centre de chaque boîte (1 goutte/boîte). Chaque concentration est répétée trois fois (fig.4). Les boîtes ont été incubées à l'obscurité à une température de  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Le témoin est réalisé dans les mêmes conditions, sans extrait aqueux et les observations et les mesures ont été effectuées quotidiennement pendant 168 h (7 jours).





**Figure04:** Diagramme expérimentale de l'essai d'activité antifongique de l'extrait aqueux

**I-5-Expressions des résultats :****I-5-1 la cinétique de croissance mycélienne :**

La cinétique de la croissance mycélienne correspond aux variations dans le temps de diamètre mycélien sous l'effet des différentes concentrations d'extrait aqueux

**I-5-2- la croissance mycélienne :**

La croissance mycélienne a été évaluée en mm a la fin de l'expérience (7 jour d'incubation (168h) en mesurant la moyenne de trois diamètres perpendiculaires passant par le milieu de la rondelle. Cette lecture est toujours réalisée en comparaison avec les cultures témoins qu'ils sont démarré le même jour et dans les mêmes conditions.

**I-5-3 - Détermination de l'indice antifongique :**

Pour chaque extrait, l'indice antifongique est exprimé par la réduction du diamètre de la colonie fongique par rapport au témoin selon la formule suivante: (Mohammedi, 2013) :

$$I(\%) = [1 - (D_{\text{test}} / D_{\text{témoin}})] \times 100$$

**D<sub>test</sub>** : diamètre de la colonie testé en mm.

**D<sub>témoin</sub>** : diamètre de colonie témoin en mm.

**I-5-4 Détermination de la vitesse de croissance mycélienne (VC) :**

Selon Cahagnier et Molard (1998) La vitesse de la croissance mycélienne de chaque concentration est déterminée par la formule :

$$VC = [D_1/Te_1] + [(D_2-D_1)/Te_2] + [(D_3-D_2)/Te_3] + \dots + [(D_n-D_{n-1})/Te_n]$$

**D**: diamètre de la zone de croissance de chaque jour.

**Te**: temps d'incubation.

**I-5-5 Observations microscopiques :**

Après 07 jours d'incubation, des observations microscopiques sont réalisées dans des Conditions aseptiques. A l'aide d'une anse stérile, on prélève des échantillons minces de la marge des espèces étudiées obtenus pour chaque concentration. Ils sont ensuite placés dans une goutte de lactophénol pour coloration entre lame et lamelle et observés sous microscope optique au grossissement (x 40).

**I-6 Test phytochimiques :**

Ce sont des techniques qui permettent de déterminer les différents groupes chimiques contenus dans un organe végétal. Ce sont des réactions physicochimiques qui permettent d'identifier la présence de substances chimiques. Les groupes phytochimiques sont nombreux, mais on peut citer les principaux : les alcaloïdes, les polyphénols (flavonoïdes, anthocyanes, tannins), les Saponosides, les stéroïdes, les terpènes...etc. (BOUGANDOURA, 2010)

**I-6-1 Détection des polyphénols :****I-6-1-1 - Détection des tanins :**

Les tanins sont mis en évidence à partir de 1 ml d'extrait, placé dans un tube en présence de quelques gouttes de FeCl<sub>3</sub> (1% préparé au méthanol). Après agitation de l'extrait, la couleur vire au bleu noir en présence de tanins galliques et au brun verdâtre en présence de tanins catéchiques (Fig.05) (Karumi et al., 2004).

**I-6-1-2- Détection des anthocyanes**

Les anthocyanes sont détectés en plaçant 5 ml d'extrait dans un tube auxquels on ajoute 15 ml d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (à 10%) (milieu acide). Après agitation, le mélange est ajouté à 5 ml NH<sub>4</sub>OH (à 10%) (milieu basique). La présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleu-violacée en milieu basique (Fig.05) (Bruneton, 1999).

**I-6-1-3- Détection des flavonoïdes :**

Un mélange de quelques gouttes de Mg<sup>2+</sup> et d'HCl concentré, placés dans un tube, est

Ajouté à 2ml d'extrait. L'apparition de la coloration rose, orange ou rouge indique la présence des flavonoïdes (Fig.05) (Malec et Pamelio, 2003).

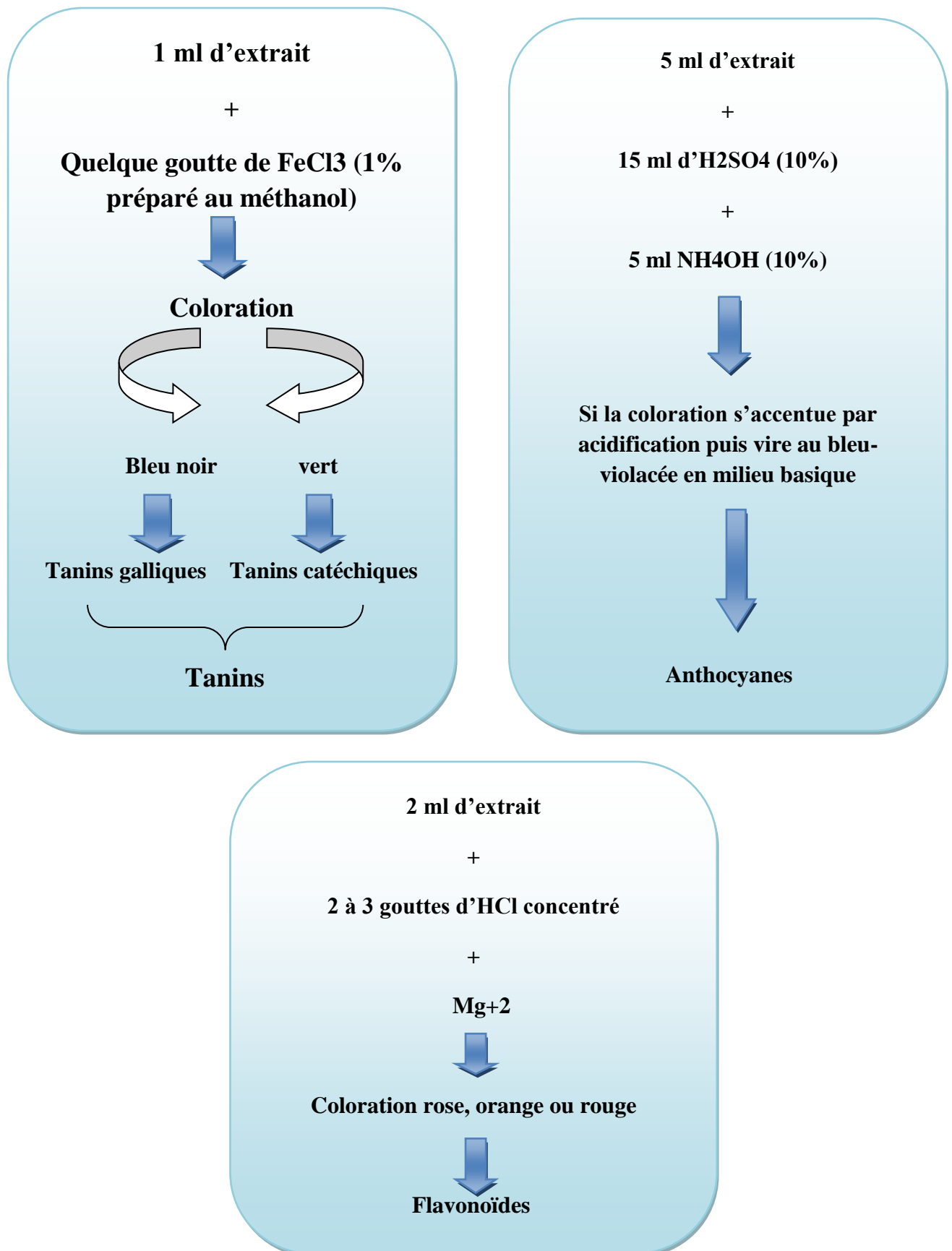
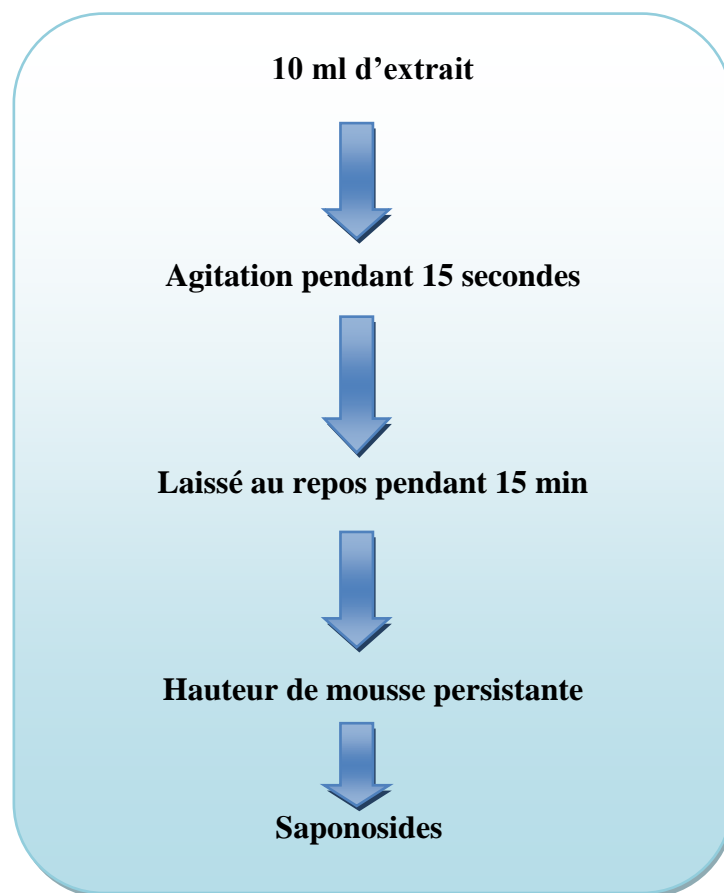


Figure 05: tests phytochimiques pour la détection des polyphénols.

**I-6-2 Détection des Saponosides :**

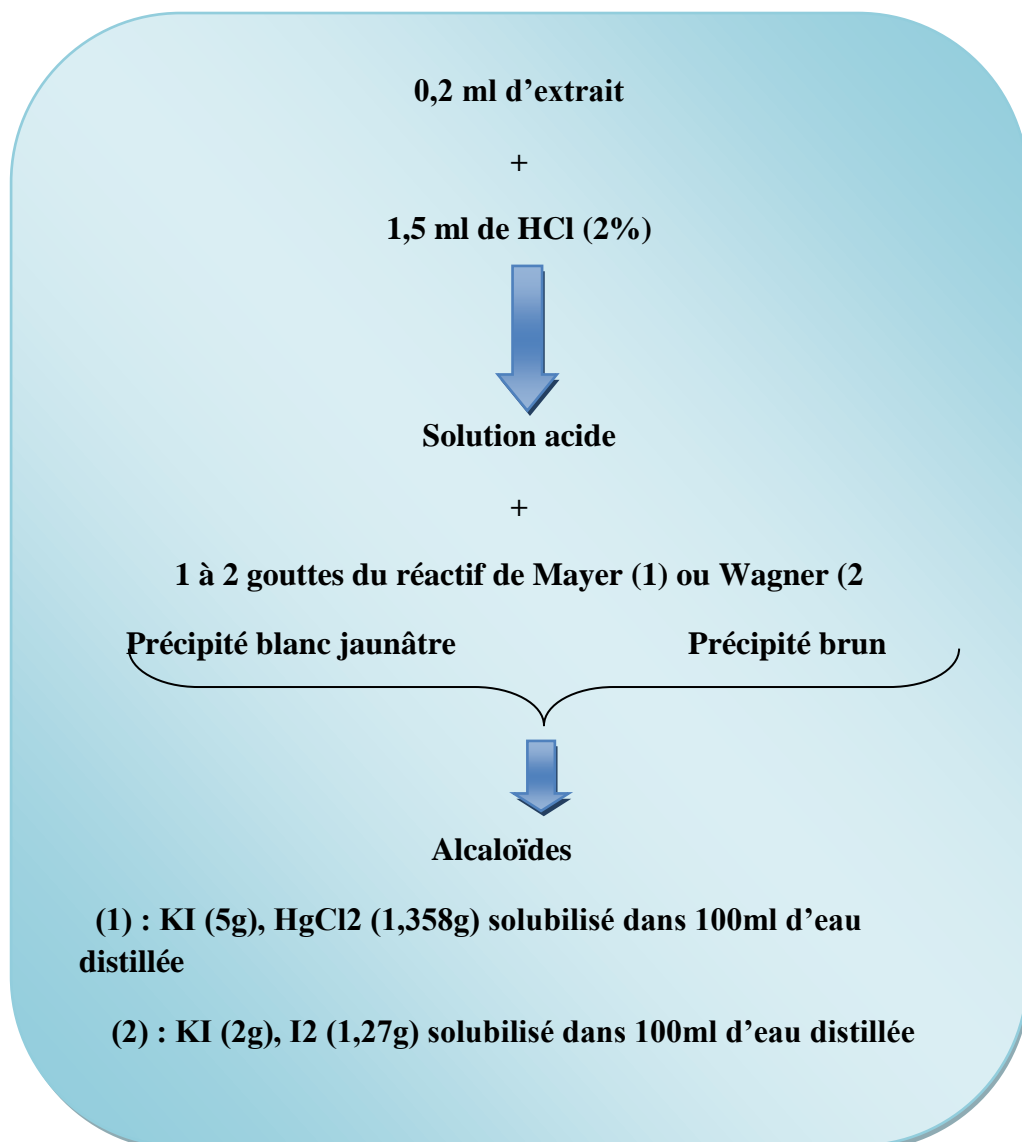
Pour la détection des Saponosides, 10 ml d'extrait placés dans un tube à essai sont agités pendant 15 secondes puis déposés durant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de Saponosides (Fig.06) (Koffi et al., 2009).



**Figure 06:** tests phytochimiques pour la détection des Saponosides.

**I-6-3- Détection des alcaloïdes :**

Les alcaloïdes ont été caractérisés à partir des réactifs de Mayer ou Wagner. 10 ml d'extrait sont évaporés jusqu'à l'obtention d'un volume de 0,2 ml, sur lequel 1,5 ml de HCl (à 2%) sont ajoutés. Après agitation de la solution acide, 1 à 2 gouttes du réactif de Mayer ou Wagner sont ajoutées. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre ou brun indique la présence d'alcaloïdes (Fig.7) (Mojab et al., 2003).

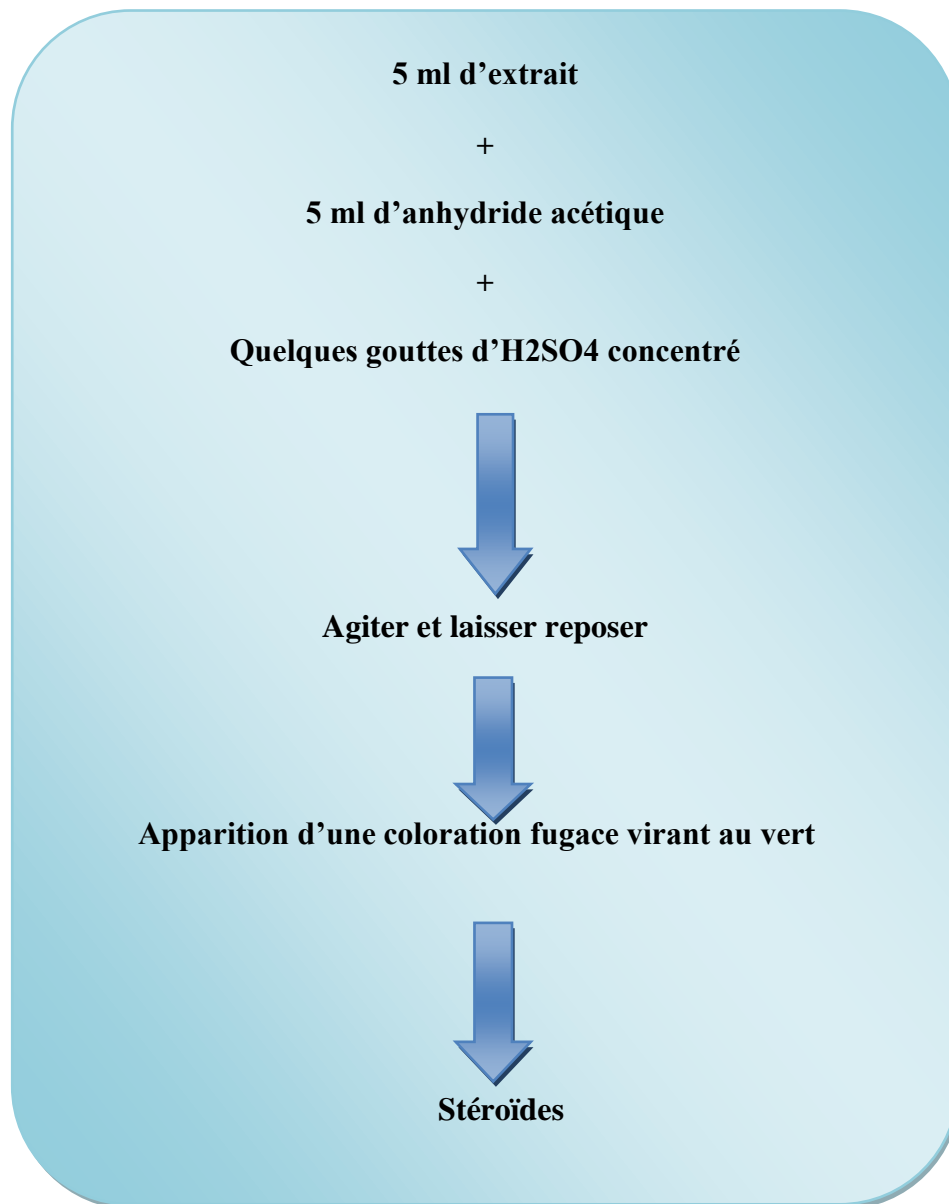


**Figure 07:** tests phytochimiques pour la détection des alcaloïdes.

#### **I-6-4- Détection des terpènes**

##### **I-6-4-1- Détection des stéroïdes :**

Les stéroïdes sont révélés après addition de 5 ml d'anhydride acétique à 5 ml d'extrait à chaud. Le mélange est ajouté à 0,5 ml d'acide sulfurique concentré. Après agitation, l'apparition à l'interphase, d'un anneau pourpre ou violet, virant au bleu puis au vert, indique une réaction positive (Fig.8) (Bruneton, 1999).



**Figure08** : tests phytochimiques pour la détection des Stéroïdes.

### **I-7- Analyse statistique**

Les données relatives à chaque essai ont fait l'objet d'une analyse de variance (ANOVA) à un facteur ou deux facteurs de classification (logiciel CoStat version 6.4) puis, si nécessaire, un classement des moyennes a été effectué à l'aide du test de LSD. Les valeurs de  $P < 0,05$  sont considérées significativement différentes.



## Résultats et discussion

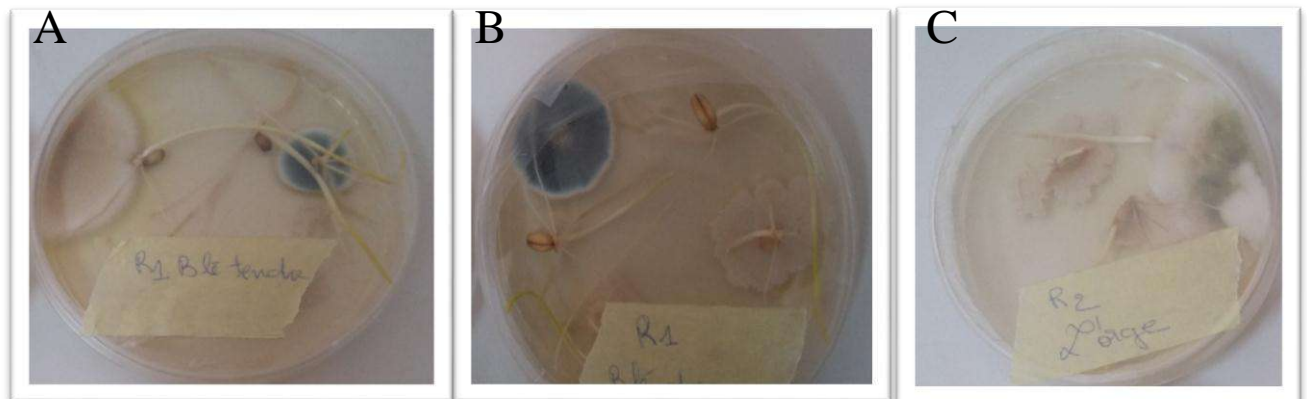


## II- Résultats et discussion

### II-1 Résultats

#### II-1-1 Isolement et purification :

Après quelques jours d'incubation des graines les premiers champignons commençaient à pousser à partir des graines de céréales. Dans chaque boîte nous avons obtenus des plusieurs colonies avec des différents aspects morphologique (photo 06), Ces dernière ont été isolées et purifiée dans des autres boites.



**Photo 06** : les souches fongique à partir des grains de céréales

#### II-1-2 Identification des isolats fongiques :

##### II-1-2-1 Identification de genre :

Après le repiquage des souches isolée et le codage on a commencés les identifications a partir du guide de **BARNETT** et **HUNTER (1972)** qui en se basant sur l'étude des caractères macroscopiques (couleur, aspect de colonie et le revers des boites ...) et microscopiques par la méthode de micro culture (forme de thalle et des spores...) des souches fongiques isolées, de ce nous avons identifié plusieurs genres.



**Photo 07 :** Caractères macroscopique et microscopique de la souche BDS isolées.



**Photo 08 :** Caractères macroscopique et microscopique de la souche SBT isolées.



**Photo 09** : Caractères macroscopique et microscopique de la souche SOR isolées.

R : recto, V : verso.

Sur la base macroscopique et l'observation microscopique au grossissement (Gx40) :

#### **La souche fongique BDS :**

Sur la base macroscopique on observe que la couleur de la colonie est bleu grisâtre avec couture blanc (recto), jaune et d'une couture blanc (verso), la texture est granuleuses. Permet de distinguer des organisations en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille. Les conidiophores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches en corémies bien individualisés. Nous pouvons déduire qu'il s'agit du genre *Penicillium*. (Photo 07).

**La souche fongique SBT :**

La caractéristique macroscopique sur la couleur de la colonie est jaune à chamois clair (recto), jaune et marron foncé au centre (verso) à une texture granuleuse. permet de distinguer les têtes conidiennes bisériées, d'abord globuleuse puis se séparent en 2 ou 3 colonnes divergentes, bien Individualisée. Les conidiophores sont rugueux et longs. Les vésicules sont globuleuses, hyalines. Les phialides sont portées par des métules, de dimensions variables. Les conidies sont globuleuses. Elles sont finement échinulées ou lisses. Les sclérotés, souvent présents, sont globuleux, ovales ou cylindriques. Nous pouvons déduire qu'il s'agit d'*Aspergillus*. (photo 08).

**La souche fongique SOR :**

sur la base macroscopique On observe que la couleur de la colonie est verte olive (recto), blanc et beige (verso) ,leur texture veloutée profondément floconneuse.mettant en évidence les têtes conidiennes petites, d'abord radiées, puis reparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées. Les conidiophores sont verruqueux. Les vésicules sont sub-globuleuses. Les phialides sont insérées directement sur la vésicule sphérique. Les conidies sont globuleuses. Nous pouvons déduire qu'il s'agit d'*Aspergillus*. (Photo 09).

**II-1-2-2 Identification des espèces par la méthode de (single spore) :**

L'identification des espèces pour les genres *Aspergillus*, *Penicillium* a été réalisée après la culture des différents milieux et à différentes températures, en se référant aux ouvrages de **PITT (1973)** et **CARLOS RAMIREZ (1982)**, la détermination des espèces se fait après lecture des diamètres, la couleur des mycéliens et des métabolites produits



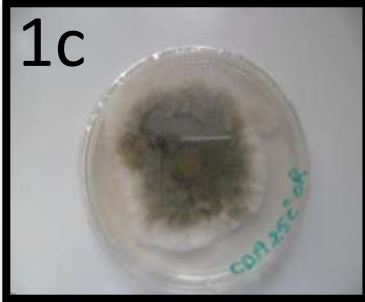


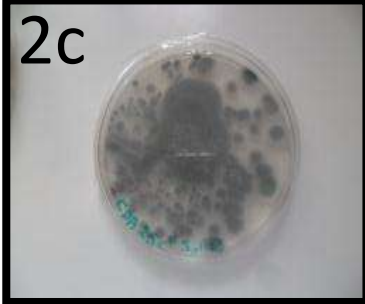


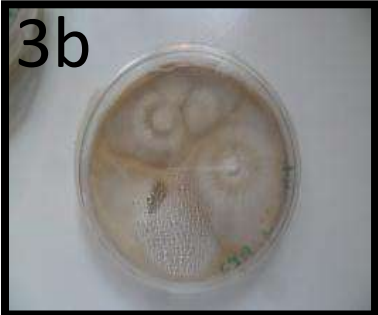
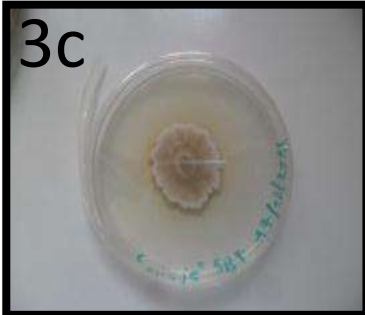

**Tableau 02** : Identification des espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* par la méthode de Single Spore.

Genres	Milieu	Lecteur	
		Couleur	Diamètre (mm)
<i>Asp SP1</i>	MEA 25 C° (photo1a)	Vert grisâtre+contour blanc	<b>70</b>
	CYA 37C° (photo1b)	Vert fonce +contour blanc	<b>40</b>
	CYA 5C°	/	<b>Absence</b>
	CDA 25C° (photo1c)	Vert fonce	<b>70</b>
	G25N 25 C° (photo1d)	Jaune	<b>40</b>
<i>PenSP2</i>	MEA 25 C° (photo2a)	Vert grisâtre + contour blanc	<b>22</b>
	CYA 37 C°	/	<b>Absence</b>
	CYA 5C°	/	<b>Absence</b>
	CDA 25C° (photo2b)	Bleu grisâtre	<b>35</b>
	G25N 25 C° (photo2c)	Blanc	<b>43</b>
<i>Asp SP3</i>	MEA 25 C° (photo3a)	Blanc+contour blanc	<b>28</b>
	CYA 37 C° (photo3b)	Beige +contour blanc	<b>48</b>
	CYA 5C°	/	<b>Absence</b>
	CDA 25C° (photo4c)	Beige +contour blanc	<b>40</b>
	G25N 25 C° (photo4d)	Blanc	<b>28</b>

*Asp* : *Aspergillus*, *Pen* : *Penicillium*.



**Tableau 03:** Identification de l'espèce d'*Aspérgillus* et *Penecillium* par la méthode de Single Spore (photos originale).

	MEA 25C°	CYA 37C°	CDA 25C°	G25N 25C°
<i>A.SP1</i>	1a 	1b 	1c 	1d 
<i>P.SP2</i>	2a 		2c 	2d 
<i>A.SP3</i>	3a 	3b 	3c 	3d 

La caractérisation macroscopique et microscopique est selon le guide de **BARNETT** et **HUNTER (1972)**, **PITT (1973)** et **CARLOS RAMIREZ (1982)** :

- Pour le code SOR l'espèce c'est : *Aspergillus flavus*.
- Pour le code SBD l'espèce c'est : *Penicillium digitatum*.
- Pour le code SBT l'espèce c'est : *Aspergillus ochraceus*.

### II-1-3 Tests phytochimiques des extraits aqueux des graines *Citrullus Colocynthis* :

Le test phytochimie qualitative se base sur des réactions colorées ou des précipitations par des réactifs chimiques spécifiques réalisées sur l'extrait qui produit à partir de la poudre de l'échantillon végétal étudié (*Citrullus Colocynthis*). (Tableau 04) .

**Tableau 04:** Tests phytochimiques effectués sur l'extrait aqueux des graines de *Citrullus Colocynthis*.

Composés Phytochimiques		Abondance
Polyphénols	Tannins galliques	-
	Anthocyanes	-
	flavonoïdes	-
Saponines		+
Alcaloïdes		+
Stéroïdes		+

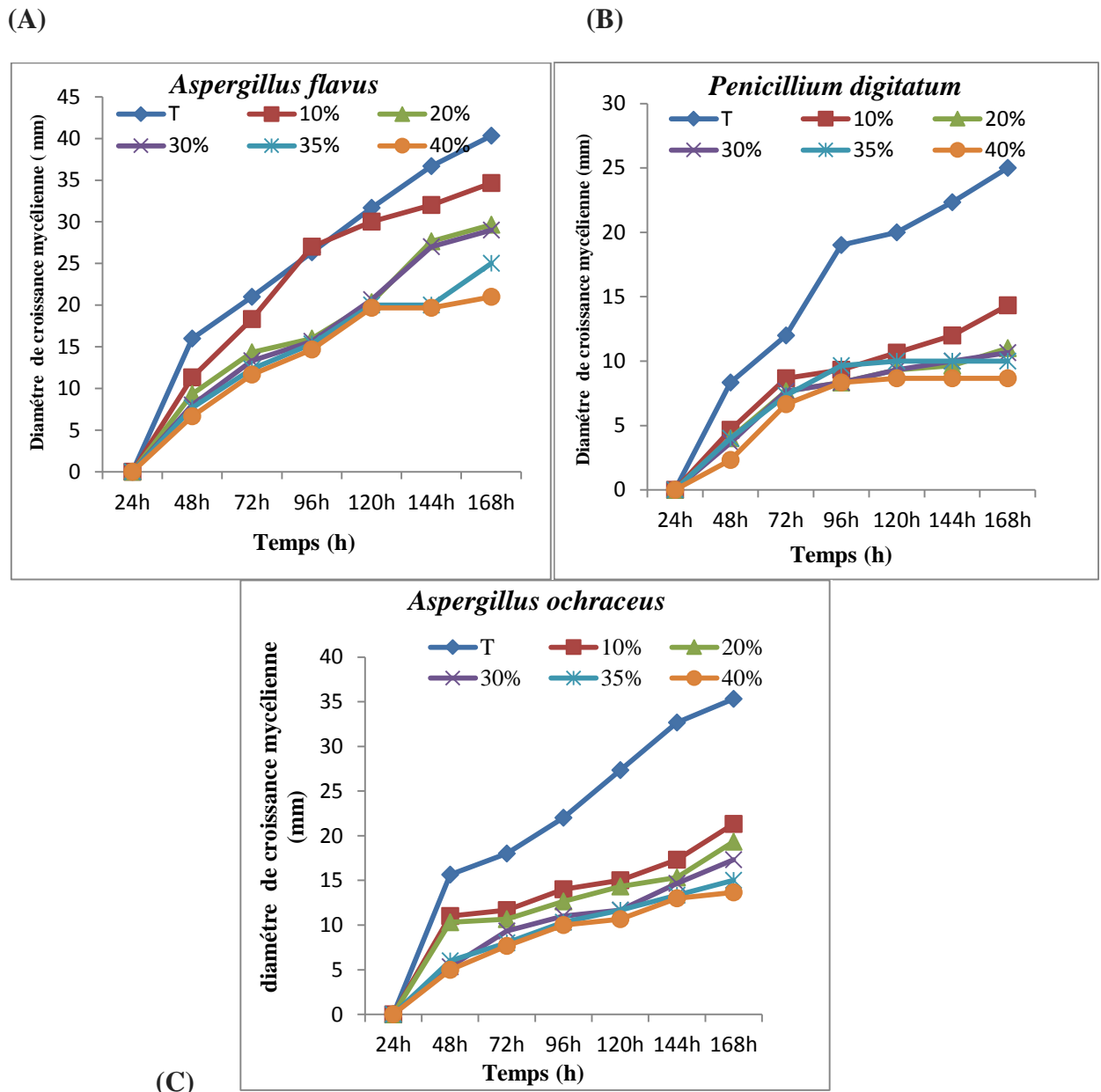
+ : Abondance, - : Absence.

Les résultats obtenus révèlent que la composition chimique de l'extrait aqueux enregistrée la présence des saponines, des alcaloïdes et des stéroïdes et l'absence totale des polyphénols.

### II.1.4 Etude de l'effet de l'extrait aqueux de *Citrullus colocynthis* (Eq Cc) sur les trois souches isolées:

#### II.1.4.1. Effet de l'extrait aqueux sur la Cinétique de Croissances mycéliennes :

La figure 09 résume les résultats d'évolution du diamètre mycélien sous l'effet de l'extrait aqueux *Citrillus Colocynthis* (.L) Shard au cours du temps d'incubation (heur).



**Figure 09:** Croissance mycélienne (mm) d'*Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus ochraceus* en fonction du temps d'incubation et de la concentration de l'extrait aqueux de *Citrullus Colocynthis*.



On observe une croissance mycélienne après 48h avec toutes les concentrations d'Eq (0%,10%,20%,30%,35% et 40%) pour *L'Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus ochraceus*.

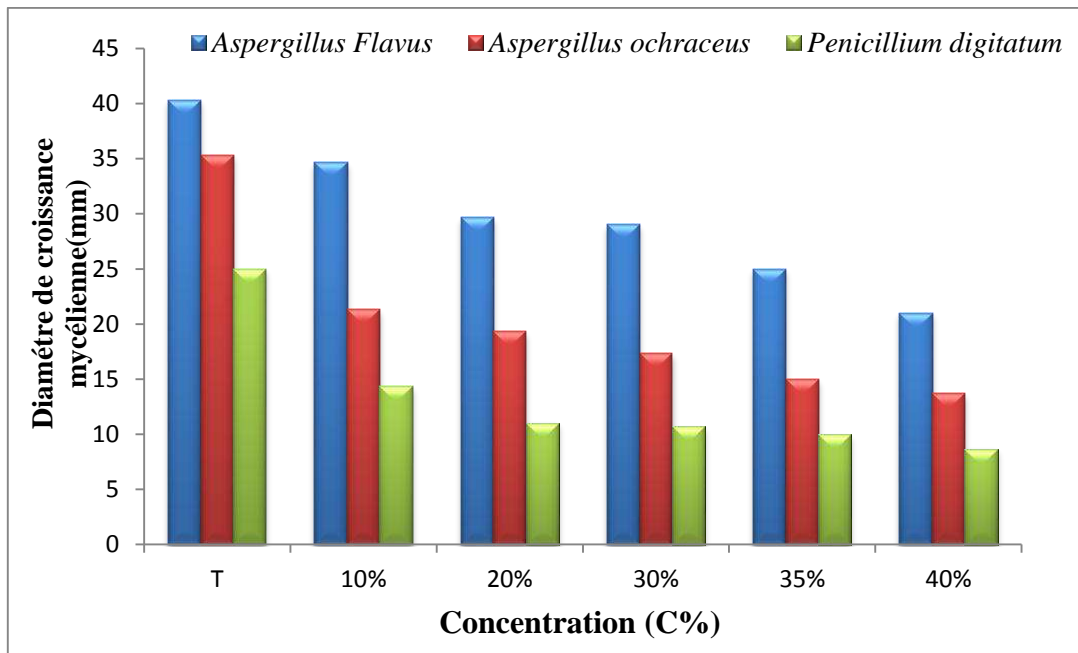
En absence de l'extrait aqueux on observe que l'évolution de la croissance mycélienne remarquable pour tous les souches fongique *A.flavus*, *P.digitatum*, *A.ochraceus* il atteint à (40,33mm ,25mm, 35,33mm) respectivement, tandis que *l'aspergillus flavus* a une concentration de 10% suivre presque la même évolution de croissance dans l'absence de l'Eq enregistre 34,66mm.

En présence de l'extrait aqueux avec une concentration on observe une évolution mycélienne moins que l'évolution dans le témoin tandis que chez *A.flavus* avec une concentration de (20%,30%,35%,40%) il atteint: 21mm et chez *A.orchaceus* avec une concentration de (10%,20%,30%,35%,40% ) il atteint : 13,66mm

Sauf que le *P.digitatum* on observe après 120 heures que l'évolution est stable qui enregistre : 8,66mm.

#### **I-4-2 Effet de l'extrait aqueux *Citrullus Colocynthis* sur la croissance mycélienne :**

A partir La figure 10, elle est mesurée diamètre mycélienne après 168h (7ème jour) d'incubation.



**Figure 10:** Effet des différentes concentrations de l'extrait aqueux sur les souches fongiques.

Nous constatons que la croissance mycélienne pour les 03 souches fongiques, avec l'augmentation des des extraits aqueux de *Citrullus Colocynthis* est augmente.

En absence de l'extrait aqueux on observe de grand diamètre de croissance mycélienne (mm) chez *l'aspergillus Flavus*, *l'Aspergillus orchaceus* et *Penicillium digitatum* en enregistrant : 40, 33, 35,33 et 25 mm respectivement.

Pour *l'Aspergillus Flavus* dans la concentration de 10% avec un diamètre de croissance de 34,66mm, puis avec une concentration de 20% le diamètre mycélien est 29,66 mm.

Pour *l'Aspergillus orchaceus* dans la concentration de 10% le diamètre mycélien enregistre 21,33mm puis avec une concentration de 20% le diamètre de croissance mycélien est : 19,33 mm.

Le *Penicillium digitatum* qui enregistre un diamètre de croissance mycélienne de 14,33 mm dans la concentration de 10%, puis avec une concentration de 20% le diamètre mycélien est : 11mm.

La croissance reste à décroître jusqu'à la concentration 40% pour les 03 souches fongique que ce soit le moins valeur de la croissance mycelienne chez *P. digitatum*

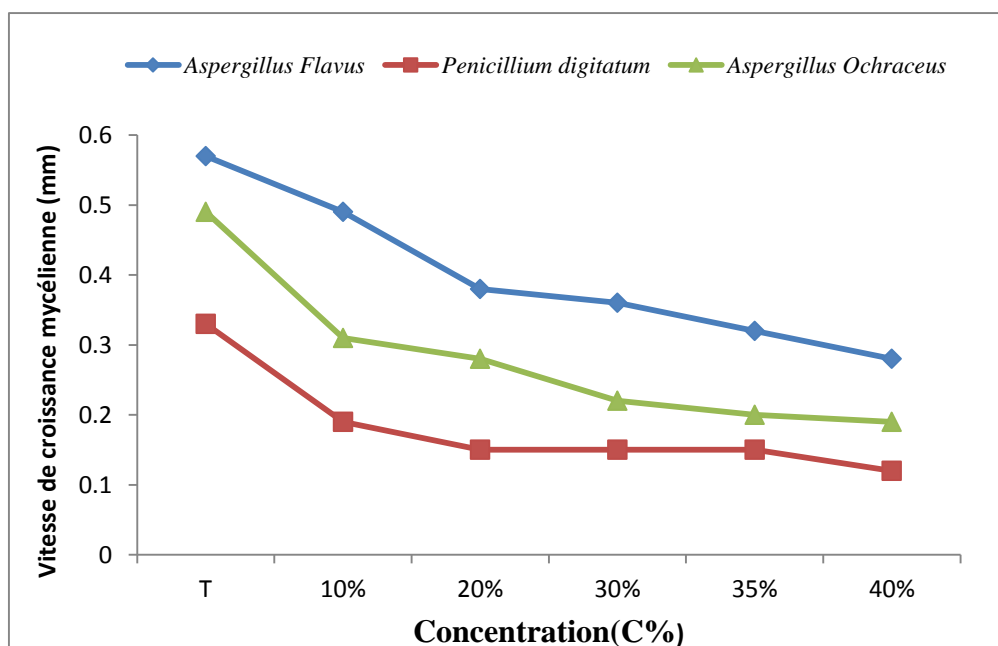
8,66mm comparativement avec les 02 souches fongique : *A.flavus* 21mm ,*A.ochraceus* 13,66mm.

Les croissances mycéliennes sont réduites avec l'augmentation de la concentration d'extrait aqueux par rapport au témoin (0%) sauf que *P.digitatum* qui présente une faible croissance, observée pour l'ensemble des concentrations d'extraits aqueux de *Citrullus Colocynthis*.

Le test de l'analyse statistique montre que l'effet de l'extrait de la plante ainsi que les champignons et les concentrations ont une déference très hautement significatif ( $P<0.01$ ).

#### II.1.4.3 Effet de l'extrait aqueux *Citrullus Colocynthis* sur la vitesse de la croissance mycélienne :

La figure 11 présente la vitesse de croissance mycélienne pour *l'Aspergillus Flavus*, *Penicillium digitatum* et *l'Aspergillus orchaceus*. dans les différentes concentrations d'extraits *Citrullus Colocynthis* .



**Figure 11:** La vitesse de la croissance mycélienne du *l'Aspergillus Flavus*, *Penicillium digitatum* et *l'Aspergillus ochraceus* sous l'effet de l'extrait aqueux.

On remarque que la vitesse la plus élevée de la croissance mycélienne est enregistrée à 0%, en l'absence d'extraits aqueux pour les toutes souches fongiques avec des vitesses de 0,57 mm/h (*A.Flavus*), 0,33mm/h (*P.digitatum*), 0,49 mm/h (*A.ochraceus*).

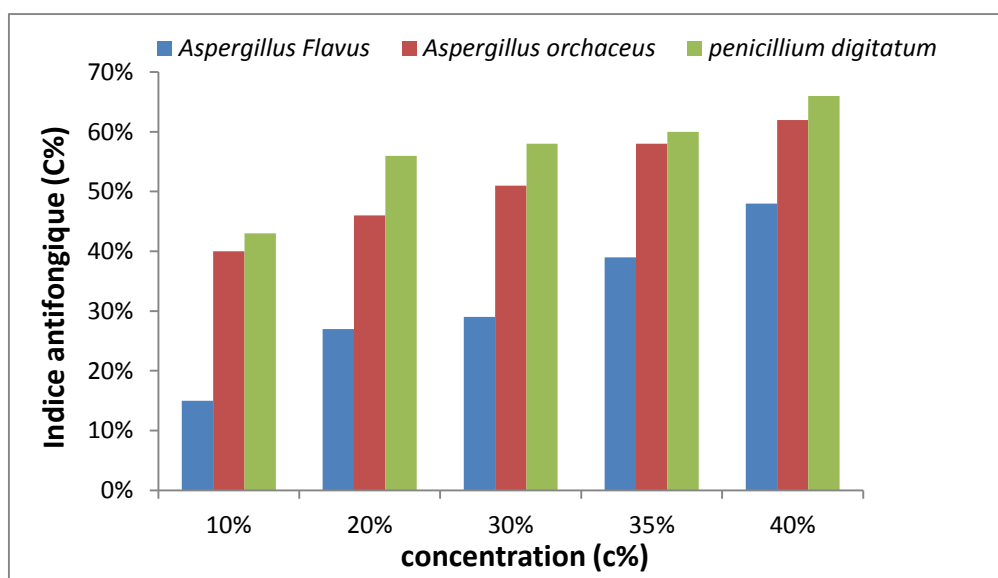
La vitesse de la croissance mycélienne décroît avec l'augmentation de la concentration de l'extrait aqueux tandis que la vitesse est plus moins chez *P.digitatum* (0,12 mm/h) que l'*Aspergillus flavus* (0,28mm/h) et l'*Aspergillus orchaceus* (0,19 mm/h).

En résultent le meilleur effet inhibiteur a été observé chez *P.digitatum* Cette souche est plus sensible aux extraits aqueux de *Citrullus colocynthis*.

L'analyse statistique montre que la différence entre les souches non significatives et aussi pour la différence entre les concentrations et l'interaction entre les souches non significatives.

#### II.1.4.5 Indice antifongique :

On remarque d'après la figure 12 que les concentrations (10%, 20%,30%,35%,40%) d'extraits aqueux de *Citrillus Colocynthis* appliquées inhibent partiellement la croissance des souches fongiques testées, le pourcentage de l'inhibition se croit proportionnellement avec l'augmentation de la concentration de l'extrait.



**Figure 12 :** Indice antifongique d'inhibition de la croissance mycélienne de *A.flavus*, *A.ochraceus*, *P.digitatum* en fonction d'extrait aqueux de *Citrillus Colocynthis*.

La concentration 40% enregistre la plus forte inhibition de la croissance mycélienne chez *P.digitatum* (66%) par rapport aux 02 autres souches *A.orchaceus* (62%) ,*A.flavus* (48%).







L'indice antifongique pour les concentrations 35% et 30% des 03 souches d'*A.flavus* *P.digitatum* , *A.orchaceus* est 39%,58%,60% et 29%,51%,58% respectivement.

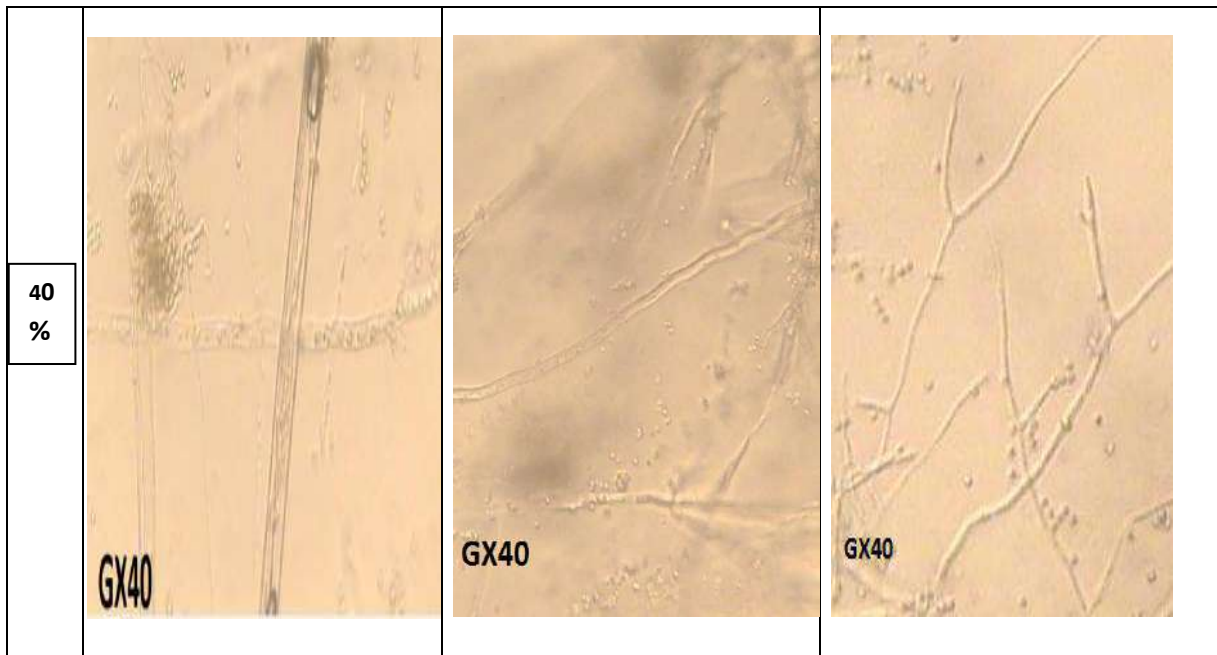
A une concentration de 10% et 20% d'extrait aqueux, l'inhibition est moins faible pour la croissance mycélienne tels que a été enregistrée pour d'*A.flavus* *P.digitatum* , *A.ochraceus* avec des indices antifongiques de 15%,40%,43% et 24%, 46%,56% .

L'analyse de variance montre que la différence entre les souches très hautement significatif et aussi pour la différence entre les concentrations et l'interaction entre les souches et les concentrations très hautement significatif.

II-1-5 Observations microscopiques :

Tableau 06 : Observations microscopiques de souches testées.

%	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>
0%	 GX40	 GX40	 GX40
10%	 GX40	 GX40	 GX40



L'observation microscopique est par comparaison au témoin montre une diminution dans :

- les diamètres de mycélium.
- les tailles de mycélium.
- le nombre de mycélium (**Témoin >10% >20% >30% >35% >40%**)
- déchirure (40%) ou commencement d'une déchirure (10%,20%,30%,35%) de mycélium ainsi que la couleur qui différent avec l'augmentation de la concentration.



**II-1-6 Discussion :**

Les isollements et l'identification des souches fongiques qui associé avec les graines de céréales (blé dur, blé tendre et l'orge) présente que le genre le plus dominants de nos échantillons est les *Penicilliums* suivis par *Aspergillus*. Ce qui correspond les études de **Benmansour-brixi (2005)** et **belyagoubi(2006)** qui ont trouvés que le taux de contamination des graines de blé par les *Aspergillus* est le plus dominant. Cette différence notifiée peut être expliquée par l'origine des grains et la durée de stockage. Soulignons aussi la forte capacité de dissémination des spores de *Penicillium* (taille et poids des spores) surtout avec les conditions climatiques.

Le genres *Penicillium* constituent la flore essentielle de stockage car ils tolèrent l'humidité la plus faible (**Adebanjo Bankole, 2003 ; Lacey J. ;Mangan N. ; 1988 et Godon et Loisel , 1987** ).ils sont aussi responsables de la plupart des accidents de conservation d'origine microbiologique pour les produits céréaliers (**Godon et Loisel, 1987**).

Notre criblage phytochimique d'extrait aqueux révèle la richesse les graines de *Citrullus colocynthis* d'un point qualitative par les métabolites secondaires tels que des stéroïdes, des alcaloïdes et des saponines et l'absence des polyphénols par contre l'étude **de Gurudeeban et al,( 2010) et Adebayo-Tayo et al., (2010)** qui ont trouvés la présence des polyphénols et défèrent dans les compositions se dépend peut être par le milieu édaphique qui vivre de cette plante avec des conditions climatique.

Concernent notre étude sur L'activité antifongique des extraits *C.colocynthis* dépend la concentration et la souche fongique ces résultat et comparable a les études de **Veldhuizen et al.,(2006) et Dan et al, (1998)** qui ont confirmé que la activité antifongique dépend par sa composition, l'organe de la plante à tester, la nature de l'extrait et les souches fongiques sélectionnées.

L'extrait aqueux de *Citrullus Colocynthis* a marqué une inhibition importante sur *A.flavus*, *P.digitatum* et *A.ochraceus* , cet extrait a inhibé de la croissance mycélienne. et la vitesse diminue avec l'augmentation de la concentration .Cette résultats à été confirmé par les travaux de (**Gacem et al., 2013**) sur d'évaluation in vitro le potentiel antifongique et d'antimycotoxigeni des graines de *C.colocynthis* contre les champignons toxigènes produisant à savoir d'*A.flavus* et d'*A.ochraceus* de mycotoxines afin de vérifier l'activité possible d'inhibition.



L'extrait aqueux de *Citrullus colocynthis* à la concentration 40% est enregistré une meilleure activité antifongique pour les trois souches *Aspergillus flavus*, *Penicillium digitatum* et *Aspergillus ochraceus* : 48%,66%,62% respectivement Ainsi, *Penicillium digitatum* est le plus sensible que les autres souches fongiques *Aspergillus flavus*, *Aspergillus orchaceus*. Cette résultats montré par l'étude de (PRABAVATHY et al., 2006 ; CHANG et al., 2008).

Les résultats de l'observations microscopiques indiquent la diminution dans les diamètres de mycélium et les tailles de mycélium avec les concentrations (de 10% à 40%) de l'extrait aqueux pour les trois souches fongiques *A.flavus*, *A.orchaceus*, *P.digitatum* avec des changements de couleurs des mycéliums selon la concentration et la souche fongique. Etaient confirmé par les travaux de A.moujahid et al., (2004) tels que son résultats l'hinibition de la croissance mycélienne d'*aspergillus niger* a partir d'utilisé des extraits d'algue de *Fucus vesiculosus* et de *Cystoseira humilis*. Garkoti et al., (2013) ont également mis en évidence l'efficacité des extraits avec une inhibition maximale enregistrée à 40 %.

Donc La diminution de la croissance mycélienne des souches fongiques reliées avec l'augmentation de la concentration d'extrait aqueux par leur composé qui est présente dans l'extrait.

Les Terpènes (stéroïdes) affectent non seulement la perméabilité, mais aussi d'autres fonctions dans des membranes cellulaire peut pénétrer dans les membranes cellulaires, pénétrer à l'intérieur de la cellule, et d'interagir avec des sites critiques tels que des enzymes et des protéines intracellulaires, conduisant à la mort cellulaire (Omidbeygi et al., 2007).

Les saponines sont une classe spéciale de glycosides qui ont d'une part, une caractéristique savonneuse et d'autre part, une très bonne activité antifongiques (SADIPO et al., 1991).

Par ailleurs, les alcaloïdes renferment un effet détoxifiant et possèdent une très bonne activité antifongique (ZEE-CHENG, 1997).



## **Conclusion**

---

## Conclusion

---

### Conclusion :

Plusieurs travaux sur l'extrait aqueux pour l'utilisation des substances naturelles dans la lutte contre les moisissures est à l'origine du choix de notre thème qui consiste l'isolement et l'identification des moisissures contaminant les graines de trois espèces de céréales (Blé tendre , Blé dur et Orge) et la recherche de l'effet de l'extrait aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* (L.) Shard sur ces champignons.

L'isolement et l'identification des souches fongique à partir des graines des céréales par les deux méthodes de micro culture et de single spore qui sont appartienne à trois espèces suivantes : *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus orchaceus*, *Penicillium digitatum*.

Le screening phytochimique de notre extraits aqueux révèle que la plante (*Citrullus colocynthis*) une source des Alcaloïdes, des stéroïdes, Saponines ces substance qui joue un rôle plus important dans l'effet antifongique.

La méthode de contact direct nous a permis de mettre en évidence le pouvoir antifongique de l'extrait vis-à-vis des 03 souches isole *A.flavus*, *Aorchaceus*, *P.digitatum* .

Nos résultats du traitement par l'extrait aqueux de *Citrullus colocynthis* justifié l'efficacité sur les 03 souches : les *Aspergillus* et *penicillium* en particulier à la concentration de 40%.

L'activité antifongique croit au fur à mesure dès que la concentration augmente de l'extrait ce la est l'induit à la diminution de la vitesse et la croissance mycélienne avec une diminution dans les diamètres, les tailles et le nombre de mycélium sous microscopique.

Les résultats de nos études indiquent que l'extrait étudié montre de bonnes activités antifongique pour les souches par la réduction de la croissance mycélienne. Ces résultats préliminaires peuvent être complétés par d'autres études plus approfondies (détermination de la concentration inhibitrice des souches, mode d'application, cout, essai sur d'autres souches, etc.) à fin d'utilisation dans un projet en biotechnologie comme un agent antifongique alternative ou comme un agent de conservation pou la lutte contre le Champignon toxigèneque .



Annexe

## Annexe

---

### Annexe



**Photo 10** : l'extrait aqueux après l'extraction



**Photo 11**: la filtration d'extrait aqueux de *citrullus colocynthis* par micro filtre.

## Annexe

---



**Photo 12:** tests photochimiques de l'extrait de fruit du *citrillus colocynthis*.



## Références bibliographiques

### Références bibliographique

- **A MOUJAHID., B BENCHARKI., L HILALI., A BAGRI., L NAJIM ., 2004.** activités antibactérienne et antifongique des extraits d'algues marines d'origine marocaine, *Biologie et Santé* vol (4).
- **ADEBAYO-TAYO BC., ADEGOKE AA., OKOH AI., AJIBESIN KK., 2010.** Rationalizing some medicinal plants used in treatment of skin diseases. *Afr. J. Microbiology. Res.* 4(10):958-963.
- **AMRAOUI K., 2014.** Etude in vitro de l'activité des huiles essentielles de quelques plantes Spontanées sur la croissance des moisissures associées aux graines des céréales. P 12 et 15.
- **BANKOLE S A., A ADEBANJO .,2003.<< Mycotoxins in food in west Africa ,current situation and possibilities it >>,African journal of biotechnology,vol.2,(9),P 254-263.**
- **BARNETT H.L., HUNTER B.B., 1972.** Illustrated genera of Imperfect fungi. Ed. Burgess publishing company. Minnesota. P 62-197.
- **BELYAGOUBI L., 2006.** effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales .thèse de magister, Algérie, Irrst.de biologie-faculté des sciences univ Abon.
- **BENMANSOUR BRIXI GORMAT N., 2005.** Etude microbiologique et mycotoxicologique des blés stockés dans la région de Tlemcen et l'influence des facteurs.
- **BOUDJOUREF., 2011.** Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'Artemisia campestris L, p 1-9.
- **BOUGANDOURA N., 2010.** Pouvoir antioxydant et antimicrobien des extraits d'espèces végétales Sature jacalaminthasspnepta (nabta)et AjujaivaL. (chendgoura) de l'ouest d'Algérie.mémoire magister;université Tlemcen.
- **BRUNETON J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 3 éme Ed, Tec &Doc Lavoisier, Paris, P 1120.
- **BRUNETON J., 1999.** Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales, 3 Eme Ed, Tec &Doc Lavoisier, Paris, p 1120.
- **CAHAGNIER B., RICHARD-MOLARD D., 1998.** Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Ed.: Lavoisier. P 39-41.



## Références bibliographiques

---

- **CAHAGNIER B., RICHARD-MOLARD D., 1998.** Moisissures des aliments peu-hydratés, les moisissures. Collection sciences et techniques agroalimentaires. Ed. : Lavoisier. P 39-41.
- Centre national de contrôle et de certification des semences et plants ., 2009.bulltin des variétés. céréales.
- **CHABASS D., 2002.** Les moisissures d'interet medical cahier n°25 de formation de biologie médicale Edit bio forma. 65: P 25-27.
- **CHAHARDEHI A-M., IBRAHIM D. ET SULAIMAN S-F., 2010.** Antioxidant, antimicrobial activity and toxicity test of Pileamicrophylla, International Journal of Microbiology: 6.
- **CHANG H., CHENG Y., WU C., CHANG S., CHANG T., SU T (2008).** Antifungal activity of essential oil and its constituents from Calocedrus macrolepis var. fomiosana Florin leaf against plant pathogenic fungi. Bioresour. Technol. 99: 6266-6270.
- **CHEHMA A M ., 2005.**Catalogue des plantes spontanées du Sahara septentrional algérien, université d'Ouargla faculté des sciences, 75 P.
- **DAN S., ALEX B., ELLA S., ZOHARA Y .,1998.** Evaluation of Citrullus colocynthis, a desert plant native in Israel, as a potential source of edible oil. J. Arid. Environ. 40:43-439.
- **DJERMOUN A., 2009.** La production céréalière en algérie : les principales caractéristiques, Université de hassiba benboulaïd de chlef ,P 2 .
- **DOUMANDJI A., DOUMANDJI-MITICHE B., SALAHEDDINE D., 2003.** Cours de technologie des céréales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage, Office des Publications Universitaires, P 1-22.
- **GACEM M A., OULD EL HADJ KHELIL A., GACEMI B., HALLA N., DJERBAOUI AMINA N., BOUDERHEM A., HADEF S., BENREGUIEG M., ADLI DJALAL E H .,2013.** Antimycotoxigenic and antifungal activities of Citrullus colocynthis seeds against Aspergillus flavus and Aspergillus ochraceus contaminating wheat stored . African Journal of Biotechnology, Vol. 12(43), pp: 6222-6231.
- **GARKOTI ET AL., 2013.** Management of vascular wilt of lentil through aqueous plant extracts in tarai region of uttarakhand state. P 263-145.
- **GODON B., LOISEL W., 1997.** << Guide pratique D'analyse Dans les industries Des céréales >> Paris : Tec et Doc : (Lavoisier).820.P : 78-83.

## Références bibliographiques

---

- **GURUDEEBAN S., RAJAMANICKAM E., RAMANATHAN T., SATYAVANI K (2010).** Antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* in gulf of mannar. *Inter. J. Curr. Res.* 2:078-081.
- **HARIS C., 1989.** Introduction to modern microbiology. Blackwell scientific publication. P 179 .
- **ISERIN P., MASSON M., et RESLELLINI J., 2001.** La rousse encyclopédie des plantes médicinales, 2 ème édition. Paris, P 335.
- **KARUMI Y., ONYAYILI P.A., OGUGBUAJA V.O., 2004.** Identification of active principals of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Sci* v(4), 179-182.
- **KOFFI N., BEUGRE K., GUEDE., ZIRIHI D., LAURENT A., 2009-**Screening phytochimique de quelques plantes médicinales ivoiriennes utilisées en pays Krobou (Agboville, Côte-d'Ivoire). *Sciences & Nature* 6 (1) : 1-15.
- **MALEC L.S., PAMILIO A.B., 2003.** Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus*. *Molecular Medicinal Chemistry* 1 : 30-38.
- **MANGAN N., LACELEY J., 1988** <<Ecological determination of mould growth in stored grain >>. *International journal of food microbiology*, Elsevier 7(3).p245-256.
- **MOHAMMEDI Z., 2013.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie. P 84.
- **MOHAMMEDI., 2013.** Etude Phytochimique et Activités Biologiques de quelques Plantes médicinales de la Région Nord et Sud Ouest de l'Algérie, P 84.
- **MOJAB F., KAMALINEJAB M., GHADERI N. ET VAHIDIPOUR H.R., 2003.** Phytochemical screening of some species of Iranian plants, *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 77-82.
- **MULTON J.L., 1982.** CONSERVATION ET STOCKAGE DES GRAINS ET GRAINES ET PRODUITS DERIVÉS- Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux, *Technique & Documentation Lavoisier Paris* Apria, V(1) : P 576.
- **MULTON J.L., 1982.** Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés. *Collection Sciences et Techniques Agro-alimentaires.* v (1).
- **OMIDBEYGI M., BARZEGAR M., HAMIDI Z ET NALHDIBADI H., 2007.** Antifungal activity of thyme, summer savory and clove essential oils against *Aspergillus flavus* in liquid medium and tomato paste. *Food Control* 18, 1518-1523.

## Références bibliographiques

---

- **PHATTAYAKORN K. ET WANCHAITANAWONG P., 2009.** Antimicrobial activity of thai herb extracts against coconut milk spoilage microorganisms, *Kasetsart J. Nat. Sci.* 43: 752-759.
- **Pitt J I., 1973** .An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycology* 65: 1135-1157.
- **PRABAVATHY V.R., MATHIVANAN N., SAGADEVAN E., MURUGESAN K., LALITHAKUMAN D., 2006** :Self-fusion of protoplasts enhances chitinase production and biocontrol activity in *Trichoderma harzianum*. *Bioresour. Technol* 97: 2330-2334.
- **RAMIREZ C., 1982.** Manual and atlas of the *Penicillium*, Elsevier Biomedical Press,Amsterdam: 231-236.
- **RAMIREZ C., 1982.** Manual and atlas of the *Penicillium*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam: 231-236.
- **RAZAK M.F., AIDOO K.E., CANDLISH A.G ., 2009.** Mixed herbs drugs inhibitory ,effect on growth of the endogenous myclflore and afataxion production *Mycopathologie* 167-273-268.
- **SADIPO O A., AKANJI M A., KOLAWOLE F B ET ODUTUGA A., 1991.**Saponin is the active antifungal principle in *Garcinia Kola*, heckle seed, *Biosci. Res. Commun* 3, 171.
- **SINGH G., MAURYA S., DE LAMPASONA M.P. AND CATALAN C., 2006.** Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food Control*, V(17) : 745–752.
- **VELDHUIZEN E., TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN C., ZWEIJTZER SA., HAAGSMAN HP., 2006.** Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food. Chem.* 54:1874-1879.
- **WAGENINGEN., 2004.** Protection des céréales et des légumineuses stockée, Inge de Groot, Pays Bas, P 6.
- **ZEE-CHENG., R.K., 1997.** Anticancer research on Loranthaceae plants. *Drugs Future* 22(5), 515-530.
- **ZORO A.B.I., KOFFI K.K. et DJÈ Y., 2003.** Caractérisation botanique et agronomique de trois espèces de cucurbites consommées en sauce en Afrique de l’Ouest: *Citrullus* sp., *Cucumeropsis mannii* Naudin et *Lagenaria siceraria* (Molina) Standl. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ* 7 (4) : 189–199.

- **Références électronique :**

[https://fr.wikipedia.org/wiki/ Citrullus\\_colocynthis](https://fr.wikipedia.org/wiki/Citrullus_colocynthis).

## Mis en évidence de l'effet de L'extrait aqueux des graines de *Citrullus Colocynthis* (L.) Schrad sur la croissance des champignons des céréales.

### Résumé :

Le présent travail vise à étudier l'efficacité de différentes concertations de l'extrait aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* (L.) Shard (0, 10, 20, 30, 35 et 40 % Eq Cc) sur la croissance des champignons de céréales stockées (Blé dur, Blé tendre, Orge). les résultats obtenus montrent que les champignons ont été isolés a partir des graines des céréales sont appartienne a trois espèces *A.flavus*, *A.orchaceus* et *P.digitatum*, ensuit les testes de l'activité antifongique de différentes concertations de l'extrait aqueux de *Citrullus colocynthis* sur les trois souche isolée possède efficacité très significative ( $p < 0,05$ ) en particulier la concentration 40% EqCc qui présente une activité antifongique est *A.flavus* (48%), *A.orchaceus* (62%), *P.digitatum* (66%), enfin l'examen phytochimiques indiquent l'extrait aqueux de *Citrullus colocynthis* contient des substances important tel que : alcaloïdes, des stéroïdes, des saponines qui sont responsable de l'activité antifongique et on remarque aussi l'absence des polyphénols.

**Mots clés :** *Citrullus colocynthis*, Extrait aqueux, test phytochimiques, céréales, champignons, Activité antifongique.

## Demonstrated study the effect *Citrullus Colocynthis* (L.) Schrad seeds aqueous extract of on the growth of cereals fungi.

### Summary:

This work focuses on study the effectiveness of different consultations of aqueous extract of the seeds from *Citrullus colocynthis* (L.) Shard (0, 10, 20, 30, 35 and 40% Eq Cc) on the growth of cereals fungus stored (durum wheat, Wheat, Barley). the results obtained show that the fungi was isolated from cereal seeds are belong to three species *A. flavus*, *A.orchaceus* and *P.digitatum* then the tests antifungal activity of different concentrations of aqueous extract from *Citrullus colocynthis* on the three isolated strains have the efficiencies haut significant ( $P < 0,05$ ) in particular the concentration 40% of EqCc were exhibits antifungal activity on *A. flavus* (48%), *A.orchaceus* (62%), *P.digitatum* (66%) finally the phytochemical examination indicate the aqueous extract of *Citrullus colocynthis* contains significant substances such as: alkaloids, steroids, saponins, which are responsible for the antifungal activity and will also be noted absence of polyphenols.

**Keywords:** *Citrullus colocynthis*, aqueous extract, phytochimic test, cereals, fungus, antifungal Activity.

## التعرف على تأثير المستخلص المائي لبذور نبات الحنظل *Citrullus Colocynthis*(L.) Schrad على نمو الفطريات المرافقة لبذور المحاصيل

### الملخص :

يهدف عملنا إلى دراسة فعالية تراكيز مختلفة من المستخلص المائي لبذور نبات الحنظل *Citrullus Colocynthis*(L.) Schrad على نمو فطريات بذور الحبوب المخزنة (القمح الصلب، القمح اللين والشعير).

النتائج المتحصل عليها بينت ان العينات المعزولة من بذور الحبوب تظهر ثلاث أنواع مختلفة و هي *A.orchaceus*, *A. flavus* و *P.digitatum* اختبار النشاط المضاد للمستخلص المائي *Citrullus colocynthis* بمختلف التراكيز على العينات المعزولة حيث يملك فعالية هامة جدا على جميع الفطريات (66%) *P.digitatum*, (62%) *A.orchaceus* : (48%) *A.flavus* الاختبار الكيميائي للمستخلص المائي (*Citrullus Colocynthis*) أظهر وجود بعض المركبات الكيميائية (ستيرويدات، القلويدات، الصابونين) التي باستطاعتها ان تقوم بالنشاط المضاد للفطريات ومع ملاحظة غياب المركبات الفينولية.

. الكلمات الدالة: *Citrullus Colocynthis*, المستخلص المائي, الاختبار الكيميائي, الحبوب, الفطريات, النشاط المضاد للفطريات.