REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE KASDI MERBAH-OUARGLA

FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET
SCIENCES DE LA TERRE ET DE L'UNIVERS

Département des Sciences de la Nature et de la Vie

Mémoire

Présenté par **GACEM Mohamed Amine**

***En vue de l'obtention du Diplôme de* Magister en biologie**

Option : Microbiologie appliquée.

THEME:

Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogéne des extraits méthanolique et aqueux des graines de Citrullus colocynthis sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké.

Soutenu publiquement le : 01/12/2011

Devant le jury:

Mr OULD EL HADJ M.D.	**Prof**	**U.K.M. Ouargla**	**Président**
Mme OULD EL HADJ-KHELIL A.	**MCa**	**U.K.M. Ouargla**	**Encadreur**
Mme BISSATI S.	**MCa**	**U.K.M. Ouargla**	**Examinateur**
Mme SIBOUKEUR O.	**MCa**	**U.K.M. Ouargla**	**Examinateur**
Mr GACEMI A.	**MAa**	**U.M.T. Saida**	**Invité**

Année universitaire : 2011 / 2012

Remerciements

Le présent travail est réalisé au laboratoire de Protection Des Ecosystèmes En Zones Arides Et Semi-Arides de l'université de Ouargla et au laboratoire de Microbiologie de l'université de Saida.

Avant toute chose, je remercie Dieu, le tout puissant, de m'avoir donné la force et la patience pour achever ce travail.

J'exprime d'abord mes profonds remerciements et ma vive reconnaissance à Mme OULD EL HADJ- KHELIL- Aminata, Maître de conférences A à la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université de Ouargla pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique. Sa disponibilité, ses conseils et la confiance qu'elle m'a accordé m'ont permis de réaliser ce travail.

Je tiens à exprimer également ma profonde reconnaissance à Mr GACEMI Abou Abd Allah Maître assistant A à l'université de Saida pour sa contribution à la réalisation de ce travail et ses précieux conseils qu'il trouve ici mes sincères remerciements.

J'adresse mes sincères remerciements à Mr OULD EL HADJ Mohamed Didi, Professeur à l'Université de Ouargla d'avoir accepté de présider le jury de ma soutenance.

J'exprime mes vifs remerciements à Mme SIBOUKEUR Oumlkhir et à Mme BISATI Samia Maîtres de conférences A à l'Université de Ouargla pour l'honneur qu'elles nous ont fait en acceptant d'examiner ce mémoire.

A Mr ADLI Djelel, Maître assistant à l'université de Saida et Mr AZZIZ Rachid Maître assistant à l'université de Tlemcen qui m'ont accueilli au sein de leurs laboratoires de substances bioactives et activités antifongiques et qui ont mis à ma disposition les conditions matérielles nécessaires pour la réalisation de ce travail tout au long de la période de recherche. Qu'ils trouvent ici mon respect et ma reconnaissance.

Table des matières

	Page
Liste des abréviations	**I**
Liste des figures	**II**
Liste des photos	**III**
Liste des tableaux	**IV**
Résumé	**V**
Abstract	**VI**
ملخص	**VII**
Introduction	**01**
PREMIERE PARTIE : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.	
I. Blé tendre et facteurs d'altération	**03**
I. 1. Classification du blé tendre	**03**
I. 2. Utilisation du blé tendre	**04**
I. 3. Variétés de blé tendre cultivées en Algérie	**04**
I. 4. Structure et composition du grain de blé tendre	**05**
I. 4.1. Structure du grain de blé tendre	**05**
I. 4.2. Composition du grain de blé tendre	**05**
I. 5. Stockage du blé tendre	**06**
I. 5.1. Stockage traditionnel du blé en Algérie	**06**
I. 5.2. Stockage du blé en silos	**07**
I. 5.3. Autres méthodes de stockage	**07**
a- Stockage en gerbes	**07**
b- Stockage en épis	**07**
c- Stockage des grains avec leurs balles	**07**
I. 6. Traitements obligatoires pour une bonne conservation	**07**
I. 6.1. Triage et nettoyage des grains	**08**
I. 6.2. Nettoyage des locaux	**08**
I. 7. Facteurs d'altération du blé tendre	**08**
I. 7.1. Altérations enzymatiques	**08**
I. 7.2. Altération d'origine mécanique ou physique	**09**
I. 7.3. Altération d'origine biologique	**09**
a- Les macro organismes	**09**
b- Les microorganismes	**10**
b1- Moisissures des céréales	**11**
α- Mycètes de champ	**11**
β- Mycètes de stockage	**11**
γ- Flore intermédiaire	**12**
I. 8. Effets néfastes des altérations	**12**
II. Mycotoxines et écotoxigénèse	**13**
II. 1. Mycotoxines	**13**
II. 1.1. Aflatoxines	**14**
a- Définition et structure chimique	**14**
b- Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines	**14**
c- Profil toxicologique de l'aflatoxine	**15**
c1- Hépatotoxicité	**15**

c2- Génotoxicité et Mutagénicité **15**
c3- Immunotoxicité **16**
c4- Tératogénicité **16**
c5- Effets antibactériens **16**
II. 1.2. Ochratoxines **16**
a- Définition et structure chimique **16**
b- Propriétés physico-chimiques de l'Ochratoxine A **17**
c- Profil toxicologique de l'ochratoxine A **17**
c1- Néphrotoxicité **17**
c2- Génotoxicité **17**
c3- Immunotoxicité **17**
c4- Tératogénicité **18**
c5- Neurotoxicité **18**
c6- Cancérogenèse **18**
II. 2. Ecotoxigénèse **18**
II. 2.1. Biosynthèse des mycotoxines **18**
II. 2.2. Facteurs de biosynthèses **19**
a- Facteurs physiques (facteurs extrinsèques) **19**
a1- Température **19**
a2- Activité de l'eau (A_w) **19**
a3- pH **20**
a4- Endommagement des grains **20**
b- Facteurs chimiques (facteurs extrinsèques) **20**
b1- Composition gazeuse **20**
b2- Traitements agricoles **20**
b3- Nature du substrat **20**
c- Facteurs biologiques (facteurs intrinsèques) **20**
II. 3. Métabolisme des aflatoxines dans l'organisme **21**

III. Généralités sur les plantes médicinales **22**
III. 1. Facteurs de variabilité des substances bioactives dans les plantes médicinales **22**
III. 1.1. Influence du cycle végétatif **22**
III. 1.2. Influence des facteurs extrinsèques **22**
III. 1.3. Influence de la récolte du matériel végétal **22**
III. 1.4. Influence des transformations du matériel végétal **23**
III. 1.5. Influence des hybridations **23**
III. 1.6. Influence du procédé d'obtention **23**
III. 2. Présentation de la coloquinte **23**
III. 2.1. Noms vernaculaires **23**
III. 2.2. Taxonomie **24**
III. 2.3. Description morphologique **24**
III. 2.4. Répartition géographique **24**
III. 2.5. Actions thérapeutiques **25**
III. 2.6. Composition chimique **25**
a- Flavonoïdes **26**
b- Saponosides **26**
c- Alcaloïdes **36**

DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE

I. Matériel et méthodes **27**

I. 1. Matériel végétal **27**
I. 1.1. Blé tendre local et importé **27**
I. 1.2. Fruit de *Citrullus colocynthis* **27**
I. 2. Matériel fongique **27**
I. 3. Méthode d'échantillonnage **28**
I. 3.1. Précautions d'échantillonnage **28**
I. 4. Etude de la qualité physicochimique, microbiologique et mycotoxicologique du blé tendre local et importé **29**
I. 4.1. Etude de la qualité physicochimique du blé tendre local et importé **29**
a- Détermination du pourcentage des grains brisés (état physique des grains) **29**
b- Détermination de l'humidité **29**
c- Mesure du pH **29**
I. 4.2. Etude de la qualité microbiologique du blé tendre local et importé **29**
a- Dénombrement de la flore fongique **29**
b- Identification des moisissures **30**
b1- Identification des genres de moisissures **31**
α- Identification des genres par la technique de scotch **31**
β- Identification des genres par la technique de micro-culture **31**
b2- Identification des espèces *Aspergillus* et *Penicillium* **31**
α- Identification des espèces *Aspergillus* **31**
β- Identification des espèces *Penicillium* **32**
I. 4.3. Analyses mycotoxicologiques **32**
a- Détection visuelle des souches productrices de mycotoxine **32**
b- Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM) **33**
c- Détection des mycotoxines au niveau du substrat **33**
I. 5. Préparation des extraits et étude phytochimique **34**
I. 5.1. Détermination de la teneur en eau des graines de *Citrullus colocynthis* **34**
I. 5.2. Préparation des extraits méthanolique et aqueux **34**
a- Extraction au méthanol **34**
b- Extraction par macération à l'eau **35**
I. 5.3. Détermination du rendement des extraits secs **35**
I. 5.4. Tests phytochimiques **35**
a- Détection des polyphénols **36**
a1- Détection des tanins **36**
a2- Détection des coumarines **36**
a3- Détection des anthocyanes **36**
a4- Détection des flavonoïdes **36**
a5- Détection des anthraquinones **36**
a6- Détection des saponosides **36**
b- Détection des terpènes **37**
b1- Détection des stéroïdes **37**
c- Détection des alcaloïdes **37**
I. 6. Essai d'activité biologique des extrait méthanolique et aqueux **37**
I. 6.1. Souches fongiques testées **37**
I. 6.2. Préparation des pré-cultures **37**
I. 6.3. Essai d'activité antifongique par la méthode de micro-dilution en milieu solide **38**
I. 6.4. Test d'activité antimycotoxinogéne **39**

II. Résultats et discussions. **40**
II. 1. Qualité physicochimique et microbiologique du blé tendre local et importé **40**
II. 1.1. Qualité physicochimique du blé tendre local et importé **40**

a- Pourcentage des grains cassés (état physique des grains) **40**
b- Humidité (H) **40**
c- pH **40**
II. 1.2. Qualité microbiologique du blé tendre local et importé **41**
II. 1.3. Identification des moisissures **41**
a- Genres fongiques identifiés par la méthode de micro-culture et de Scotch **41**
b- Espèces fongiques identifiées par la méthode de « Single spore » **42**
II. 1.4. Dénombrement de la flore fongique **45**
II. 1.5. Révélation mycotoxicologiques **48**
a- Révélation des souches productrices de mycotoxines par milieu CEA **48**
b- Révélation des souches productrices de mycotoxines par CCM **48**
c- Révélation des mycotoxine au niveau des substrats **48**
Discussion **49**
Conclusion **52**
II. 2. Etude phytochimique des graines de *Citrullus colocynthis* **53**
II. 2.1. Taux d'humidité des graines de *Citrullus colocynthis* **53**
II. 2.2. Rendements des extractions méthanoliques et aqueuses **53**
II. 2.3. Tests phytochimiques des extraits des graines de *Citrullus colocynthis* **54**
Discussion **54**
Conclusion **56**
II. 3. Activité biologique des extraits méthanolique et aqueux **57**
II. 3.1. Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux **57**
a- Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus flavus* **58**
b- Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus fumigatus* **59**
c- Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus niger* **60**
d- Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus ochraceus* **61**
II. 3.2. Activité antimycotoxinogéne des extraits méthanolique et aqueux **62**
a- Effet des extraits méthanolique et aqueux sur la biomasse fongique formée **62**
b- Effet des extraits méthanolique et aqueux sur la synthèse de l'AFB1 et l'OTA **63**
Discussion **63**
Conclusion **66**

Conclusion générale et perspectives **68**
Références bibliographiques **70**
Annexe

Liste des abréviations.

AFB1	Aflatoxine Blue 1.
AFB2	Aflatoxine Blue 2.
AFG1	Aflatoxine Green 1.
AFG2	Aflatoxine Green 2.
AFM1	Aflatoxine Milk 1.
AFNOR	Association française de normalisation.
AGPI	Acide gras polyinsaturé.
$\mathbf{A_{max}}$	Absorbance maximale.
$\mathbf{A_w}$	Activité de l'eau.
CCM	Chromatographie couche mince.
CEE	Communauté économique européenne.
CMF	Concentration minimale fongicide.
Da	Dalton.
DMSO	Diméthylsulfoxyde.
Eaq	Extrait aqueux.
EMeOH	Extrait méthanolique.
HR	Humidité relative.
IANF	Indice antifongique.
MeOH	Méthanol.
Milieu AFPA	Milieu Aspergillus Flavus Parasiticus Agar.
Milieu CDA	Milieu Czapek Dox Agar.
Milieu CEA	Milieu Coconut Extract Agar.
Milieu CYA	Milieu Czapek Yeast Agar.
Milieu DRBC	Milieu Dichloran Rose Bengal Chlorotétracycline.
Milieu G25N	Milieu Glycérol Nitrate Agar.
Milieu MEA	Milieu Malt Extract Agar.
Milieu PDA	Milieu Potatoes Dextrose Agar.
Milieu PDAa	Milieu Potatoes Dextrose Agar acidifié.
Milieu YES	Milieu Yeast Extract Sucrose.
OAIC	Office algérien interprofessionnel des céréales.
OEPP	Organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes.
OTA	Ochratoxine A.
OTB	Ochratoxine B.
OTC	Ochratoxine C.
PM	Poids moléculaire.
ppb	Partie par billion.
Rd	Rendement.
RF	Facteur de rétention.
UF	Unité fongique.
UV	Ultra-violet.
ε	Coefficient de distinction molaire.

Liste des figures.

page

Figure 01. Coupe schématique d'un grain de blé **05**
Figure 02. Structure chimique des aflatoxines **14**
Figure 03. Structure chimique des ochratoxines **16**
Figure 04. Voies de biosynthèse des mycotoxines **18**
Figure 05. Biotransformation de l'aflatoxine dans l'organisme humain **21**
Figure 06. Schéma des différentes parties de *Citrullus Colocynthis* **24**
Figure 07. Situation des différentes stations de prélèvements des échantillons **27**
Figure 08. Techniques d'isolement et de dénombrement des souches fongiques **30**
Figure 09. Inoculation des isolats d'*Aspergillus* (sur les différents milieux de cultures) **32**
Figure 10. Inoculation des isolats de *penicillium* (sur les différents milieux de cultures) **32**
Figure 11. Procédé d'extraction des mycotoxines **33**
Figure 12. Procédé d'extraction des mycotoxines à partir du substrat solide **34**
Figure 13. Préparation de la poudre des graines de *Citrullus colocynthis* **34**
Figure 14. Extraction méthanolique à partir des graines de *Citrullus colocynthis* **35**
Figure 15. Extraction aqueuse à partir des graines de *Citrullus colocynthis* **35**
Figure 16. Schéma des tests phytochimiques pour la détection des polyphénols **36**
Figure 17. Schéma du test phytochimique pour la détection des stéroïdes **37**
Figure 18. Schéma du test phytochimique pour la détection des alcaloïdes **37**
Figure 19. Détermination de la CMF des extraits des graines de *Citrullus colocynthis* **38**
Figure 20. Moyennes des grains cassés des échantillons de blé tendre local et importé **40**
Figure 21. Humidité relative moyenne des échantillons de blé tendre local et importé **40**
Figure 22. pH moyen des échantillons de blé tendre local et importé **40**
Figure 23. Moyennes de la mycoflore de blé tendre local détectée sur milieu PDA **45**
Figure 24. Moyennes de la mycoflore de blé tendre importé détectée sur milieu PDA **45**
Figure 25. Moyennes de la mycoflore de blé tendre local détectée sur milieu CDA **46**
Figure 26. Moyennes de la mycoflore de blé tendre importé détectée sur milieu CDA **46**
Figure 27. Moyennes de la mycoflore de blé tendre local détectée sur milieu DRBC **47**
Figure 28. Moyennes de la mycoflore de blé tendre importé détectée sur milieu DRBC **47**
Figure 29. Humidité relative de la poudre des graines sèches de *Citrullus colocynthis* **53**
Figure 30. Rendements des extractions méthanolique et aqueuse **53**
Figure 31. Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus flavus* **58**
Figure 32. Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus fumigatus* **59**
Figure 33. Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus niger* **60**
Figure 34. Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus ochraceus* **61**
Figure 35. Biomasses fongiques formées par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* en présence et en absence d'extrait méthanolique **62**
Figure 36. Biomasses fongiques formées par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* en présence et en absence d'extrait aqueux **62**

Liste des photos.

page

Photo 01. Siège de l'office algérien interprofessionnel des céréales de la wilaya de Saida **27**
Photo 02. Fruit de *Citrullus colocynthis* **27**
Photo 03. Méthode d'identification microscopique des moisissures **31**
Photo 04. Micro-culture des moisissures pour l'identification microscopique **31**
Photo 05. Dénombrement des souches fongiques sur les milieux d'isolements **41**
Photo 06. Aspect microscopique des souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* **42**
Photo 07. Identification des espèces *Penicillium* par la méthode de Single Spore **43**
Photo 08. Identification des espèces *Aspergillus* par la méthode de Single Spore **44**
Photo 09. Détection sous UV des souches productrices de mycotoxines sur milieu CEA **48**
Photo 10. Détection des souches productrices de mycotoxines par CCM **48**
Photo 11. Détection de mycotoxines du blé tendre local et importé **48**
Photo 12. Extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* **53**
Photo 13. Effet du DMSO sur les différentes souches fongiques **57**
Photo 14. Activité antifongique de l'extrait méthanolique sur *Aspergillus flavus* **58**
Photo 15. Activité antifongique de l'extrait aqueux sur *Aspergillus flavus* **58**
Photo 16. Activité antifongique de l'extrait méthanolique sur *Aspergillus fumigatus* **59**
Photo 17. Activité antifongique de l'extrait aqueux sur *Aspergillus fumigatus* **59**
Photo 18. Activité antifongique de l'extrait méthanolique sur *Aspergillus niger* **60**
Photo 19. Activité antifongique de l'extrait aqueux sur *Aspergillus niger* **60**
Photo 20. Activité antifongique de l'extrait méthanolique sur *Aspergillus ochraceus* **61**
Photo 21. Activité antifongique de l'extrait aqueux sur *Aspergillus ochraceus* **61**
Photo 22. Activité antimycotoxinogéne des extraits des graines de *Citrullus colocynthis* **63**

Liste des tableaux

	page
Tableau 01. Classification du blé tendre	**03**
Tableau 02. Composition chimique d'un grain de blé tendre	**05**
Tableau 03. Principaux genres bactériens rencontrés sur le grain du blé tendre	**10**
Tableau 04. Moisissures et mycotoxines retrouvées dans certains aliments	**14**
Tableau 05. Propriétés physicochimiques des aflatoxines	**15**
Tableau 06. Activité de l'eau optimale pour la croissance de certaines espèces d'*Aspergillus sp* et de *Penicillium sp*	**19**
Tableau 07. Origines et dates de prélèvements des échantillons	**27**
Tableau 08. Identification des espèces *Penicillium* par la méthode de Single Spore	**43**
Tableau 09. Identification des espèces *Aspergillus* par la méthode de Single Spore	**44**
Tableau 10. Tests phytochimiques effectués sur les extraits méthanoliques et aqueux des graines de *Citrullus colcoynthis*	**54**

Résumé

Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogéne des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké.

Les extraits de plantes et leurs constituants ont une longue histoire comme agents antifongique. Cependant, leur utilisation comme préservateurs de blé tendre a été rarement rapportée. Ce travail porte sur l'étude *in vitro* de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* (L.) Schard, une plante aromatique et médicinale de la flore du Sahara algérienne, vis-à-vis de quelques champignons pathogènes de contamination de blé tendre stocké.

L'étude de la qualité du blé tendre local et importé a montré que le taux de contamination de la variété importée est très élevé. Le genre *Aspergillus* représenté par des espèces différentes a été retrouvé dans les deux variétés analysées avec une fréquence et une abondance allant de 41 à plus de 86% de la flore totale identifiée sur milieu CDA et PDA. Les genres *Penicillium* et *Alternaria* sont peu fréquents. Enfin, Les genres *Cladosporium*, *Ulocladium* et *Fusarium* sont les moins abondants dans les deux variétés de blé tendre analysé. Parmi ces moisissures au moins deux espèces du genre *Aspergillus* sont potentiellement toxinogènes.

L'analyse phytochimique des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* a révélé la présence de quelques groupes chimiques (polyphénols totaux, stéroïdes et alcaloïdes) susceptibles d'exprimer les activités antifongiques recherchées. L'activité antifongique des extraits est testée par la méthode de micro-dilution en milieu solide afin de calculer l'indice antifongique. Les résultats suggèrent que l'extrait méthanolique a empêché totalement la croissance mycélienne d'*A. fumigatus* et *A. niger* avec une CMF de 2.5% (25mg/ml) et *A. ochraceus* avec une CMF de 0.5% (5 mg/ml) enregistrant un indice antifongique de 100%. A la même concentration 2.5% (25mg/ml) l'extrait aqueux a inhibé la croissance d'*A. ochraceus*. Les deux extraits possèdent un bon pouvoir antimycotoxinogéne. La synthèse d'AFB1 et d'OTA produites par *A. flavus* et *A. ochraceus* est bloquée en présence des extraits dans le milieu YES. Les résultats montrent que les extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* utilisés à faible concentration pourraient avoir un potentiel important pour le contrôle biologique des champignons dans les denrées alimentaires.

Mots clés : Blé tendre, *Citrullus colocynthis,* extrait aqueux, extrait méthanolique, analyse phytochimique, indice antifongique, pouvoir antimycotoxinogène.

Abstract

Contribution to study of the antifungal and antimycotoxigenic activity of methanol and aqueous extract of seeds of *Citrullus colocynthis* against some fungi isolated from wheat stored.

Plant extracts and their constituents have a long history as antifungal agents. However, their use to preserve wheat has rarely been reported. This work is based on *in vitro* study of the antifungal and antimycotoxinogénic activity of methanol and aqueous extracts of the seeds of *Citrullus colocynthis* (L.) Schard, an aromatic and medicinal plant of the flora of the Algerian Sahara, against some pathogenic fungi contaminated the stored wheat.

The study of the quality of local and imported wheat has shown that the rate of contamination of the imported variety is very high. The genus *Aspergillus* represented by different species was found in two varieties which had been analyzed with a frequency and an abundance ranging from 41 to more than 86% of the total flora in CDA and PDA. Whereas *Penicillium* and *Alternaria* are uncommon. Finally, the genus *Cladosporium*, *Fusarium* and *Ulocladium* are less abundant in the wheat varieties analyzed. Among these molds at least two species of the genus *Aspergillus* are potentially toxigenic.

The phytochemical analysis of methanol and aqueous extracts of the seeds of *Citrullus colocynthis* revealed the presence of some chemical groups (total polyphenols, steroids and alkaloids) that can express the desired antifungal activities. To calculate the index antifungal, the antifungal activity of extracts was tested by the method of micro-dilution in a solid medium. The results suggest that the methanol extract has completely inhibited mycelial growth of *A. fumigatus* and *A. Niger* with MFC = 2.5% (25mg/ml) and *A. ochraceus* with MFC = 0.5% (5 mg / ml), the index antifungal is 100%. At the same concentration of 2.5% (25mg/ml) the aqueous extract inhibited mycelial growth of *A. ochraceus*. Both extracts have good power antimycotoxinogénic. The synthesis of AFB1 and OTA is blocked in the presence of extracts in the mid YES. The results show that the methanol and aqueous extracts of the seeds *of Citrullus colocynthis* used at low concentrations can have great potential for biological control of fungi in food.

Key words: wheat, *Citrullus colocynthis*, aqueous extract, methanol extract, phytochemical analysis, index antifungal, antimycotoxinogénic power.

الملخص:

دراسة نشاط المستخلصات المائية و المثانولية لبذور نبات الحنظل على بعض الفطريات المعـــزولة من القمح اللين المخزن.

المستخلصات النباتية ومكوناتها لها تاريخ طويل كعامل مضاد للفطريات بينما استعمالها كحافظ للقمـــح اللين نادرا ما درست. هذا العمل يرتكز على دراسة نشاط المستخلصات المائية و المثانولية لبذور نـــبات الحنظل, الذي هو نوع من النباتات العطرية و الطبية المستعمل في الصحراء الجزائرية, ضد بعض الفـــــطريات و سمومها المعزولة من القمح اللين.

دراسة نوعية القمح اللين المحلي و المستورد أظهرت أن نسبة تلوث القمح اللين المستورد بالفـــطريات أكثر من نسبة تلوث القمح المحلي. لقد أظهرت الدراسة أن نوع الفطر *Aspergillus* و الممثل بأصـــناف متنوعة وجد بنسبة تتراوح ما بين 41% و 86% في وسط الزرع CDA و PDA. الفـــطريات *Penicillium* و *Alternaria* وجدت بنسب قليلة، و أخيرا الفطريات *Cladosporium*، *Ulocladium* و *Fusarium* كانت جد قليلة في كل من نوعي القمح المستورد و المحلي. من بين هده الفطريات صنفين من النـــــــوع *Aspergillus* وجدتا مفرزتين للسموم.

التحليل الكيميائي النباتي للمستخلصات المائية و المثانولية لبذور نبات الحنظل أظـــــهرت وجـــود بعض المجموعات الكيميائية (البولي فنول الكلي, الستيرويد و الألكلويد) التي يمكن أن تقوم بالأنشطة المطلوبة ضد الفطريات. دراسة نشاط مستخلصات بذور الحنظل أثبتت أن المستخلصات المثانولية منعت تماما نمـــــــو الفطرين *A.fumigatus* و *A.niger* عند التركيز 2.5% (25ملغ/مل) و الفطر *A.ochraceus* عنـــــد التركيز 0.5% (5ملغ/مل). عند التركيز 2.5% (25ملغ/مل) مـنع المـــستخلص المائي لبـــذور الحنظل نمو الفـــــطر *A.ochraceus*. المستخلصان المذكوران منعا تركيب الســـــــمين OTA و AFB1 المـــــــفرزين من طرف الفطرين *A.ochraceus* و *A.flavus* في وسط الزرع YES. النتائج بينت أن المـــــستخلصات المائية و المثانولية لبذور نبات الحنظل و المستعملة بتراكيز ضعيفة يمكن لها أن تلعب دورا هاما في المـــــراقبة البيولوجية للفطريات الموجودة في المواد الغذائية.

الكلمات المفتاحية : القمح اللين، الحنظل، مستخلص مائي، مستخلص ميثانولي، التحليل الكيميائي النباتي، مضاد فطري.

Introduction.

Introduction

Les graines de céréales constituent, depuis toujours, la principale ressource alimentaire de l'Homme et de l'animal et possèdent un pouvoir nutritionnel important. Dans la plupart des cas, la production des céréales est assurée par une seule récolte dans l'année alors que la consommation est prolongée toute au long de l'année, d'où la nécessité du stockage. Malheureusement, de nombreux agents de détériorations (vertébrés, insectes, moisissures, acariens,…) sont la cause de la perte d'une grande partie des récoltes de céréales. Les moisissures et leurs métabolites secondaires entraînent, à l'échelle mondiale, des pertes de céréales et leurs dérivées estimées de 5 à 10% **(PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)**.

La sécrétion des métabolites secondaires hautement toxiques, par les champignons mycotoxinogènes au cours de leur prolifération sur les céréales stockées, constitue un danger réel pour la sécurité sanitaire de l'Homme et de l'animal. En Angleterre, en 1960, l'ingestion d'une farine importée du Brésil, contaminée par *Aspergillus flavus* a entraîné la mort brutale d'une centaine de milliers de volailles. Cet événement dénommé autrefois tout simplement « Turkey-X- Disease » a donné le départ d'une série d'études et de recherches sur les substances actives élaborées par les moisissures. D'ailleurs, dans la même année (1960), le nom d'aflatoxine est attribué à cette nouvelle toxine **(TANTAOUI, 1977).**

D'après **STEYN (1998)**, les aflatoxines sont sécrétées par des souches d'*Aspergillus flavus, Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus nomius,* alors que pour les ochratoxines, elles sont élaborées par *Aspergillus ochraceus***.** Ces mycotoxines sont caractérisées par leur fluorescence sous les rayons UV et par leur thermorésistance **(KURTZMAN et *al.*, 1987).**

La toxicité chronique des aflatoxines et des ochratoxines survient après l'ingestion répétée de doses très faibles de ces mycotoxines. Des résultats *in vivo* ont montré que l'aflatoxine B1 provoque très fréquemment des mutations. Les aflatoxines et les ochratoxines provoquent un ensemble de pathologies animales surtout chez les animaux qui se nourrissent des céréales contaminées **(AGUILLAR et *al*., 1993).**

La recherche de nouvelles stratégies de prévention contre les infections et les maladies d'origine fongique, comporte un intérêt majeur, d'une part pour la sécurité sanitaire des aliments et la santé du consommateur et d'autre part, pour la protection de l'économie du pays.

Malgré les études multiples sur l'utilisation de la coloquinte dans le domaine culinaire et celui de la médecine traditionnelle, peu de travaux ont été réalisé sur l'effet antifongique et antimycotoxinogène des graines de cette espèce.

L'utilisation des substances naturelles dans la lutte contre les moisissures des céréales stockées est à l'origine du choix de notre thème qui consiste en l'extraction de quelques métabolites des graines de *Citrullus colocynthis* et la recherche de leurs effets antifongiques par la méthode de micro-dilution en milieu solide sur des souches fongiques potentiellement toxinogène isolées et identifiées à partir du blé tendre local et importé stocké. L'activité antimycotoxinogène a été testée seulement sur les souches fongiques productrices d'aflatoxines B1 et G1 et d'ochratoxines A.

Pour se faire, une synthèse bibliographique représentant la première partie de notre étude a été réalisée afin de regrouper les informations essentielles sur le blé tendre et les éventuelles moisissures toxiques pouvant se développer lors de son stockage et une étude sur *Citrullus colocynthis* et ses activités biologiques.

Dans la seconde partie de notre étude, la méthodologie est représentée par les techniques utilisées pour la réalisation de ce travail suivie des principaux résultats et leurs discussions.

L'étude est achevée par une conclusion générale et des perspectives.

Première partie : étude bibliographique.

Blé tendre et facteurs d'altération.

I. Blé tendre et facteurs d'altération

Les céréales sont un groupe de plantes cultivées appartenant, botaniquement parlant, à la famille des poacées dont les graines présentent par leur abondance et leur composition un intérêt majeur pour l'alimentation de l'Homme et des animaux. Les graines alimentaires appartiennent à une dizaine d'espèces végétales. Les plus employées sont : le blé, le maïs et l'orge **(REED, 1992)**.

Le choix de conditions convenables d'entreposage des graines de céréales pendant des périodes prolongées revêt une grande importance économique ; cela est particulièrement vrai dans les régions sous-développées, ou il n'est pas rare de perdre près de 30% de la récolte du fait des rongeurs, des insectes et d'autres facteurs de détérioration **(DRUVEFORS, 2004)**.

De mauvaises conditions d'entreposage peuvent provoquer divers phénomènes indésirables. La germination, qui peut intervenir une fois terminée la période de dormance, entraine une protéolyse et une amylolyse défavorable en panification. La prolifération de moisissures provoque non seulement une hydrolyse de glycolipides et de phospholipides, mais peut donner lieu aussi à la formation de mycotoxines **(CHEFTEL et CHEFTEL, 1977)**.

I. 1. Classification du blé tendre

Les principales espèces de céréales cultivées appartiennent à la famille des poacées (blé tendre, blé dur, maïs, riz, avoine, seigle, millet, sorgho) ou des polygonacées (sarrasin) **(MOLINIE et *al*., 2005)**. D'après **DOUMANDJI** et ***al*** **(2003)**, le blé tendre appartient à la classification illustré dans le tableau 01.

Tableau 01. Classification du blé tendre (DOUMANDJI et *al*., 2003).

Classification	Blé tendre
Règne	Plantae (Règne végétale)
Division	Magnoliophyta (Angiospermes)
Classe	Liliopsida (Monocotylédons)
S/Classe	Commelinidae
Ordre	Poale
Famille	Poaceae (ex Graminées)
S/Famille	Triticeae
Tribu	Tritceae (Triticées)
S/Tribu	Triticinae
Genre	*Triticum*
Espèce	*Triticum aestivum* L. ou *Triticium vulgare*

I. 2. Utilisation du blé tendre

Le blé est à l'origine même de l'agriculture. Il reste, après des millénaires, la première plante cultivée au monde **(DURON, 1999)**. Il existe deux espèces de blé : le blé tendre (*Triticum vulgare*) et le blé dur (*Triticum durum*).

L'espèce la plus cultivée est le *Triticum vulgare* qui est celle de tous les blés dits tendres **(CHEFTEL et CHEFTEL, 1977)**. Il est essentiellement utilisé par l'industrie meunière pour la fabrication de farines destinées à l'alimentation humaine (panification, biscuiterie, pâtisserie …etc) et animale (sons) **(DURON, 1999)**.

L'espèce *Triticum durum* ou blé dur renferme une forte teneur en protéines (13%). Cette espèce est utilisée d'une part par les semouleries et les industries de pâtes alimentaires et d'autre part, pour en faire des aliments pour les animaux **(DURON, 1999)**.

I. 3. Variétés de blé tendre cultivées en Algérie

Selon l'institut technique des grandes cultures, 3 à 4 variétés sur une vingtaine de variétés de blé tendre sont cultivées en Algérie **(DOUMANDJI et *al*., 2003)** ; il s'agit de :

- **Mahon Demias :** C'est un blé introduit par les premiers colons français en Algérie. Il est rustique et tardif. Doté d'une paille haute, cette variété est à semer en zones sèches et sur les sols légers.
- **Anza :** D'origine américaine (Californie), est la variété de blé tendre connu partout en Algérie. C'est une variété précoce (plus précoce que Hidhab), elle est productive grâce à son tallage épi élevé.
- **Florence Aurore :** C'est une variété obtenue par le Pr. Schribaux. La variété se caractérise surtout par la présence de trois arrêtes longues bien différenciées au sommet de l'épi. Elle est de moins en moins cultivée en Algérie.
- **Hidhab :** La variété précoce à paille moyenne et à épi long. Elle est résistante à la verse et à la rouille brune. Hidhab présente de bonnes caractéristiques technologiques pour la panification **(DOUMANDJI et *al*., 2003)**.

I. 4. Structure et composition du grain de blé tendre

I. 4.1. Structure du grain de blé tendre

Physiologiquement, le grain des poacées est un caryopse blanc ou roux, ovoïde, pesant de 35 à 45 mg (le grain est soudé aux parois de l'ovaire) jouant le rôle d'un fruit renferment une graine, (cotylédon qui représente 82 à 85% du grain) **(GODON, 1991)**.

L'espèce *Triticum vulgare* est composée de trois parties essentielles (l'enveloppe, l'amande farineuse et le germe). Chacune de ces parties est formée de réseaux très complexes qui font encore l'objet de nombreuses recherches **(CHEFTEL et CHEFTEL, 1977)**.

Le germe qui donne la plantule, l'amande appelée endosperme ou albumen, tissu de stockage qui fournit au germe les réserves nécessaires pour sa croissance et les enveloppes protectrices sont composées par la paroi de la graine (testa) et par la paroi du fruit (péricarpe) **(DOUMANDJI et *al*., 2003)**.

La structure des grains de diverses céréales est assez semblable. La figure 01 illustre les différentes parties composant une graine de blé.

I. 4.2. Composition du grain de blé tendre

Selon **ALAIS** et **LINDEN (1997)** les graines céréalières sont surtout amylacées. Le tableau 02 résume la composition chimique d'un grain de blé tendre.

Tableau 02. Composition chimique d'un grain de blé tendre (GODON, 1991 ; CHEFTEL et CHEFTEL, 1977).

	Eau (%)	Glucides totaux (%)	Matière protéique (%)	Matière grasse (%)	Matière minérale (%)
Blé entier	13	68 - 72	10	I,5 - 2	1,7 - 2.1
Enveloppe	13	65 - 68	17 - 19	4 - 5	6 - 7
Amande farineuse	13	74 - 76	9 - 12	0,7 - 1	0,4 - 3
Germe	13	37 - 43	22 - 32	15 - 18	4 - 5

En nutrition humaine, les céréales constituent la base de la pyramide alimentaire puisqu'elles représentent la principale source de calories **(BOURGEOIS et *al.,* 1996).** Ils sont une source d'énergie car l'amidon est le glucide le plus consommable **(CHEFTEL et CHEFTEL, 1977)**.

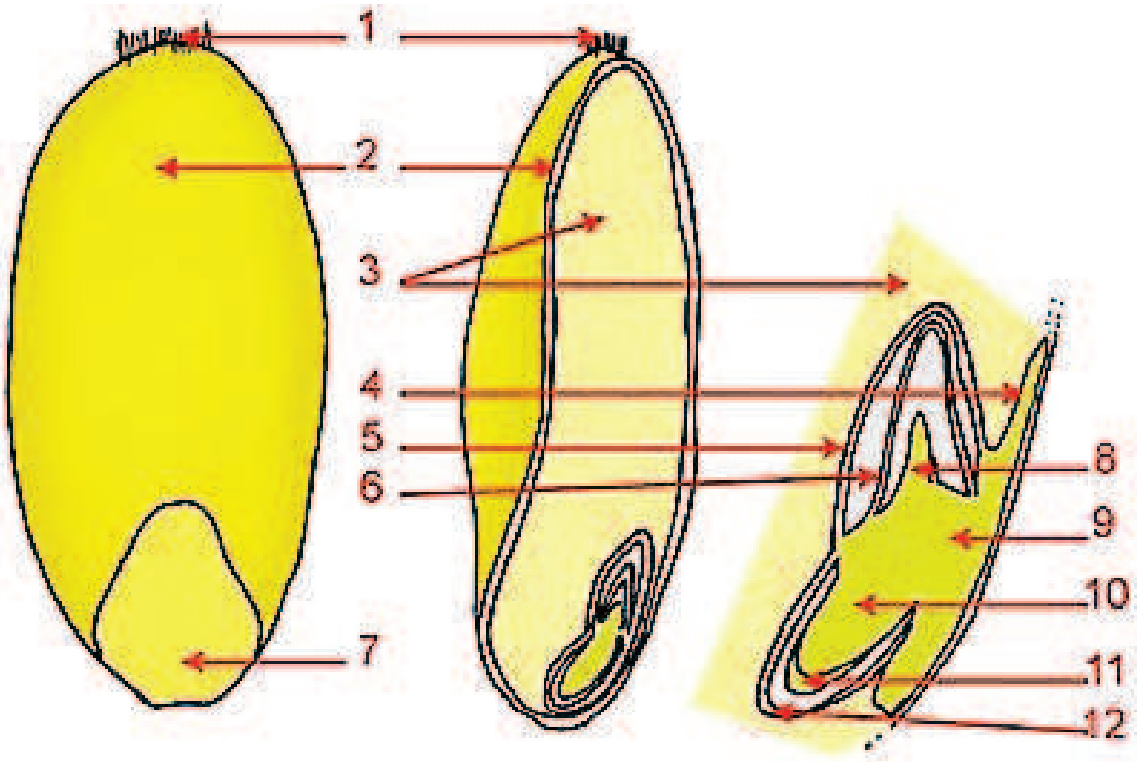


Figure 01. Coupe schématique d'un grain de blé (CHEFTEL et CHEFTEL, 1977).

(1) : poils (stigmates). **(2)** : téguments (écorce). Le caryopse est un fruit car l'écorce est le résulat de la fusion des téguments de la graine et de la paroi de l'ovaire. **(3)** : albumen. **(4)** : cotylédon unique. **(5)** : épicotyle (capuchon recouvrant la gemmule). **(6)** : première feuille. **(7)** : scutelum. **(8)** : gemmule. **(9)** : tigelle. **(10)** : radicule. **(11)** : coiffe. **(12)** : coléorhize (capuchon recouvrant la radicule).

Chacune des parties de graine fournit d'importants nutriments. L'endosperme fournit des glucides, le germe fournit des protéines, des acides gras polyinsaturé (AGPI) et des vitamines du groupes B **(BOURGEOIS et *al.*, 1996)**.

Les graines, qui constituent l'organe de réserve des végétaux, sont donc des corps riches en glucides (65 à 85%). La matière azotée est la deuxième en importance et se retrouve surtout dans le germe. Les graines de blé constituent une source importante de protéines comprise entre 8% et 14% et notamment un faible pourcentage d'acides aminés tels que la lysine, le tryptophane, la valine et la méthionine. Les lipides des céréales ont un rôle limité sur le plan nutritionnel, mais jouent un rôle important sur les qualités de gluten. Quant aux facteurs vitaminiques, les grains de blé renferment une quantité importante de vitamines BI, B2, B6 et la vitamine E **(CHEFTEL et CHEFTEL, 1977)**.

I. 5. Stockage du blé tendre

La consommation quotidienne est assurée par une seule récolte, quelquefois deux dans l'année d'où la nécessité du stockage. En outre, les grains stockés sont utilisées comme des semences en attendant la saison suivante **(DRUVEFORS, 2004)**.

Plus l'humidité des grains est importante à la récolte, plus les conditions sont favorables au développement des microorganismes. De bonnes pratiques de conservation consistent à éviter son altération en contrôlant les principaux facteurs de détérioration **(MOLINIE et *al.*, 2005)**.

Autrement dit, le but des technologies de conservation est de préserver par des moyens appropriés l'intégrité des principales qualités des graines qui ne peuvent pas être améliorées pendant le stockage **(CHAWLA, 1984)**.

Les premiers systèmes de stockage étaient de grands paniers faits de roseaux ou fioles d'argiles qui sont enfoncées dans le sol, ainsi que des puits, des structures de bois et des puits garnis de paille **(DRUVEFORS, 2004)**.

I. 5.1. Stockage traditionnel du blé en Algérie

Le paysan algérien, sur les hauts plateaux, conservait surtout le produit de ses champs d'orge et de blé, dans des enceintes creusées dans un sol argileux ; c'est ce qu'on appelle « El matmour » ou dans des sacs en toile de jute, entreposés dans divers locaux, magasins ou hangars. La trop forte humidité et les eaux d'infiltration sont les inconvénients majeurs de cette méthode de stockage favorisant le développement des moisissures et les phénomènes de fermentations bactériennes **(DOUMANDJI et *al.*, 2003)**.

I. 5.2. Stockage du blé en silos

De nos jours, les silos permettent de stocker les différents types de céréales en même temps ; ils s'agit de multi-produits **(DURON, 1999)**. Ce sont des enceintes cylindriques en béton armé ou en métal inoxydable. L'emploi des silos réduit la main d'œuvre, augmente l'aire de stockage et supprime l'utilisation des sacs onéreux **(DOUMANDJI et *al*., 2003)**.

I. 5.3. Autres méthodes de stockage

a- Stockage en gerbes

C'est la méthode traditionnelle appliquée depuis le haut Moyen age au moins dans presque toute l'Europe non méditerranéenne. On peut entasser les gerbes en plein air (gerbiers, meules), mais cette variante semble plutôt récente (18ème siècle) car l'usage le plus courant étant le stockage en grange. En gerbes, le grain est à l'abri de l'échauffement et du charançon **(MULTON, 1982)**.

b- Stockage en épis

Le stockage en épis est une technique très répandue pour toutes sortes de céréales dans le monde. Il demande bien moins de volume que le stockage en gerbes, d'où un coût moindre en bâtiments et par conséquence le contrôle de l'ambiance du stockage est plus facile **(MULTON, 1982)**.

c- Stockage des grains avec leurs balles

Bien qu'il soit assez peu fréquent, ce mode de stockage n'est pas sans intérêt. Il semble que la présence des balles ralentisse la propagation des insectes ou celle de l'échauffement par rapport à ce qui se passe dans le grain en vrac, sans exiger beaucoup de volume supplémentaire. Le mélange grains-balles est parfois stocké en grenier, comme le grain en vrac. Plus souvent, semble-t-il, il est stocké dans un contenant clos, quoiqu'à parois non étanches au gaz **(MULTON, 1982)**.

I. 6. Traitements obligatoires pour une bonne conservation

Les bonnes pratiques de conservation des céréales consistent à maintenir le plus longtemps possible la qualité du produit en agissant sur les divers facteurs d'altération. Le nettoyage des grains de blé tendre et des locaux est tant une excellente mesure préventive qui évite la contamination **(COTTY et BHATNAGAR, 1994)**.

Deux types de traitement sont connus :

- Ceux appliqués directement sur les aliments ;
- Ceux qui visent à limiter les sources de contamination **(BOURGEOIS et *al.*, 1996)**.

I. 6.1. Triage et nettoyage des grains

Le séchage et la désinfection des grains avant le stockage sont indispensables pour une bonne conservation. Il s'agit de pré-nettoyer les grains lors de la mise en stockage. Le principe d'aspiration d'air au travers du flux de grains est utilisé pour éliminer les poussières et les impuretés légères. Les grains sont ensuite triés et nettoyés en choisissant judicieusement la dimension des grilles **(MULTON, 1982)**.

Il est également souhaitable d'éliminer les grains blessé ou cassé. La décontamination microbiologique de la surface des grains, y compris celle des enveloppes enfouies au sein du silo est un autre objectif parfois recherché (un nettoyage standard permet de réduire jusqu'à 60% de la flore microbienne du grain), de plus, il faut éviter de blesser et de casser les grains **(CHEFTEL et CHEFTEL, 1977)**.

Pour la désinfection, il est conseillé selon **MULTON (1982)** d'utiliser les acides organiques tels que l'acide propionique et l'acide formique, qui permettent d'inhiber (à titre préventif) pendant des durées importantes, les moisissures, sans aucun risque pour le consommateur.

I. 6.2. Nettoyage des locaux

Le nettoyage des parois des locaux de stockage est une excellente mesure préventive qui évite la contamination des lots sains. C'est ainsi que les parois des silos, les appareils de transport devraient être régulièrement nettoyés, en éliminant les poussières et les déchets végétaux et éventuellement désinfectés en pulvérisant les pesticides tel que les fumigènes qui permettent une lutte biologique et un assainissement immédiat des lots de stockage **(MULTON, 1982)**.

I. 7. Facteurs d'altération du blé tendre

I. 7.1. Altérations enzymatiques

Les altérations enzymatiques dues aux enzymes propres aux grains se manifestent de façon variée. Ce sont d'abord des hydrolases, agissant sur les protéines, les lipides et les glucides donnant des produits qui peuvent se dégrader ensuite par autres voies **(MULTON, 1982)**.

C'est ainsi que les lipases libèrent des acides gras qui sont ensuite oxydés par la lipoxygénase. Les amylases hydrolysent l'amidon en sucres fermentescibles. Il ne faut pas négliger cette altération enzymatique car certains produits peuvent être toxiques tel que les produits de la fermentation **(AFNOR, 1986)**.

Les réactions de Maillard donnent aussi un grand nombre de composés intermédiaires (dont l'activité physiologique a été reconnue) aboutissant dans leur stade ultime à la formation de composés brunâtres avec une destruction des vitamines B1, E et les caroténoïdes **(AFNOR, 1986)**.

I. 7.2. Altération d'origine mécanique ou physique

Les altérations d'origine mécanique sont dues à des chocs entrainant des cassures et favorisant les autres causes d'altération. L'utilisation des radiations telles que les rayons gamma et les rayons ultra-violet (UV) peuvent provoquer des altérations radiochimiques tels que la pyrolyse, redistribution de l'eau dans le grain et l'adhésion de l'amidon et des constituants protéiques **(AFNOR, 1986)**.

I. 7.3. Altération d'origine biologique

Un lot de grains entreposé comporte inévitablement au moins deux entités vivantes : les grains eux-mêmes et les micro-organismes. De façon non obligatoire, mais cependant fréquente, on y trouve également associés des insectes, des acariens, voire de petits vertébrés (rongeurs, oiseaux) **(MULTON, 1982)**.

La microflore des grains est banale, à tendance xérophile et cosmopolite. Les bactéries, les levures et les mycètes filamenteux constituent un envahisseur interne et/ou contaminant externe qui font l'objet d'altération biologique **(MAGAN et *al.,* 2003)**. Les virus paraissent négligeables, et les lichens sont parmi les rares organismes vivants capables de supporter sans dommage une grande siccité : leurs teneurs en eau se situent entre 5 et 40%, contre 75 à 97% pour le reste du monde vivant **(MULTON, 1982)**.

a- Les macro organismes

Divers petits vertébrés rongeurs (souris, rats et oiseaux) peuvent vivre aux dépends des stocks de grains mal protégés, dont ils peuvent consommer des quantités considérables **(MULTON, 1982)**. De plus ils peuvent jouer le rôle d'un vecteur de germes pathogènes provoquant des contaminations et des lésions physiques dans les tissus végétaux qui favorisent donc la pénétration des spores **(JOUANY et YIANNIKOURIS, 2002)**.

La présence de la plupart des arthropodes, et singulièrement d'acariens, est révélatrice de mauvaises conditions de conservation. Les acariens vivant sur les grains moisis, récupèrent et transportent les spores de champignons sur leur corps, mais également dans leur tube digestif et leurs fèces. Beaucoup d'acariens consomment les moisissures, préférant d'ailleurs les espèces les plus abondantes **(MOLINIE et *al*., 2005)**.

Les insectes, endommagent l'enveloppe des grains, ce qui favorise la pénétration des moisissures à l'intérieur de la graine. Quelques insectes disséminent des espèces mycotoxigéniques. Là où les insectes et les rongeurs sont contrôlés, les moisissures sont souvent la cause unique de la détérioration **(MAGAN et *al.,* 2003)**.

b- Les microorganismes

Les grains fraichement récoltés constituent une niche écologique pour plusieurs types de bactéries (Tableau 03). La population bactérienne est essentiellement constituée par des eubactéries qui renferment une très forte proportion d'entérobactéries, notamment de coliformes qui sont toujours abondantes sur les céréales **(WITHLOW et HAGLER, 2001)**.

Tableau 03. Principaux genres bactériens rencontrés sur le grain du blé tendre (BOURGEOIS et *al.,* 1996).

Familles	Genres et espèces	Pourcentage des grains contaminés
Bacillaceae	*B.cereus* *B.subtilis*	18 36
Entérobactériaceae	*Acrobacter sp* *Escherichia coli* *Paracolobacterium sp*	54 9 90
Lactobactériaceae	*Leuconostoc sp* *Lactobacillus sp* *Streptococcus sp*	9 présence présence
Micrococcaceae	*M.candidus* *M.caseolyticus*	48 48
Pseudomonadaceae	*Pseudomonas sp*	73

Comme pour les bactéries, les populations de levures dépendent fortement des conditions climatiques au moment de la récolte. Les genres rencontrés sont : *Saccharomyces, Candida, Hansenula*…etc. Ces genres ne donnent généralement lieu qu'à de faibles niveaux de contaminations, ne dépassant que rarement quelques centaines de germes par gramme de grain. Au contraire, des quantités élevées de levures sont souvent le signe d'une humidité élevée **(BOURGEOIS et *al.,* 1996)**.

Des très grands nombres de moisissures sont capables de détériorer les denrées alimentaires. Ces moisissures sont le plus souvent des saprophytes banaux. La mycoflore est estimée entre 200 000 et 300 000 espèces **(PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)**. Les plus répandues sont les *Penicilliums* et les *Aspergillus* qui sont aérobies strictes (omniprésentes dans la nature), hétérotrophes, peu exigeantes et possédant un potentiel élevé de sécrétion d'enzymes exo-cellulaires. Ces types de moisissures sont capables de se développer sur toutes sortes de nourriture : céréales, viande, lait, fruits, légumes, … etc **(FILTENBORG et *al*., 1996)**.

b1- Moisissures des céréales

Plus de 150 espèces de moisissures filamenteuses ont été trouvées sur les grains de céréales comme contaminants extérieures. Les graines sont naturellement en contact avec des spores fongiques avant, pendant et après la récolte, durant le transport et le stockage. La croissance fongique est régie par de nombreux paramètres physico-chimiques, notamment la quantité d'eau libre (A_w), la température, la présence d'oxygène, la nature du substrat et le pH **(JOUANY et YIANNIKOURIS, 2002)**.

Les moisissures se développant aux champs nécessitent une forte humidité pour leur croissance (20 à 25%), alors que les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant de 10 à 18 % d'humidité **(MOLINIE et *al*., 2005)**.

Les mycètes colonisant le grain ont été classifiés dans trois groupes, connus sous le nom de moisissures de champ, de stockage et la flore intermédiaire **(MAGAN et LACEY, 1988)**.

α- Mycètes de champ

Les céréales sont contaminées par des espèces rassemblant les moisissures qui s'implantent sur le grain avant la récolte. La plupart de ces espèces appartenant notamment aux genres *Alternaria*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, *Trichoderma*, …etc. Beaucoup de ces champignons sont fortement cellulotiques, provoquant certaines maladies telle que la fusariose provoquée par le *Fusarium* **(AKINSANMI et *al*., 2004)**.

β- Mycètes de stockage

Les facteurs environnementaux peuvent exercer une pression sélective influençant la structure de la communauté et la dominance de quelques espèces mycotoxigéniques **(MAGAN et *al*., 2003)**.

Au cours du stockage en silo, se développe une flore composée de champignons moins cellulotiques et plus osmophiles, éliminant peu à peu les champignons du champ et provoquant une acidification du substrat ; ce sont essentiellement des *Aspergillus* (*A. candidus*, *A. ochraceus*, *A. versicolor*), des *Eurotiums* (*E. amstelodami*, *E. chevalieri*, *E. repens*) et des *Penicilliums* (*P. cyclopium*, *P. glabrum*, *P. spinulosum*, *P. stoloniferum*) ainsi que *Absidia*, *Mucor* et *Rhizopus*. L'évolution de cette charge fongique s'est révélée proportionnelle à la teneur en eau et donc à l'activité de l'eau (l'A_w) **(LARPENT, 1990)**.

γ- Flore intermédiaire

Une troisième catégorie de moisissures constitue la flore intermédiaire et regroupe des germes capables d'un développement limité, mais qui peuvent prédominer largement en conditions particulières, tels que ; *Cladosporium*, *Trichoderma* et surtout les mucorales comme *Rhiropus*, *Absidia*, *Mucor*, accompagnée avec des levures du genre *Candida* et *Torulopsis* **(GODON et LOISEL, 1997)**.

I. 8. Effets néfastes des altérations

Les grains de céréale forment un excellent milieu de culture pour les moisissures. Pendant le stockage, les céréales subissent généralement une perte de qualité, assurée par une infection des mycètes, des insectes et des acariens. Cette détérioration est caractérisée par une diminution de la germination, une décoloration, des changements chimiques et nutritionnels, un durcissement et de mauvais goûts qui ont comme conséquence le rejet du produit **(MILLS, 1990)**.

L'activité fongique mène également aux pertes de matière sèche et de la valeur nutritive ainsi qu'à des problèmes de santé dus à la formation des mycotoxines et des spores allergéniques **(OLSSON, 2000)**, et aussi aux modifications des propriétés rhéologiques du grain **(MOLINIE et *al*., 2005)**.

Certaines espèces fongiques sont responsables de mycoses et de réactions allergiques chez l'Homme et l'animal. Les effets les mieux connus sont ceux provoqués par *Aspergillus fumigatus* responsable d'aspergillose pulmonaire et de mammites chez les animaux **(BAUER et GARIES, 1987)**.

Mycotoxines et écotoxigénèse.

II. Mycotoxines et écotoxigénèse

II. 1. Mycotoxines

Dès le moyen âge, les chroniques décrivent les effets mortels de l'ergot du seigle dont l'agent causal *Claviceps purpurea*, est responsable de l'élaboration d'une toxine mortelle : l'ergotamine. Ensuite des études permettaient d'isoler du maïs contaminé par *Penicillium,* l'acide pénicillique première mycotoxine identifiée **(PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)**.

En Angleterre en 1960, l'ingestion d'une farine d'arachide importée du Brésil et contaminée par *Aspergillus flavus* a entraîné la mort brutale d'une centaine de milliers de dindonneaux après l'apparition des premiers symptômes. Cet événement dénommé autrefois tout simplement « *Turkey-X-Disease »* a donné le départ d'une série d'études et de recherches physicochimiques et toxicologiques sur les substances actives élaborées par les moisissures. Ainsi, en 1960, le nom d'aflatoxine est attribué à cette nouvelle matière toxique **(MILLER et TRENHOLM, 1994)**.

L'enquête réalisée à l'échelle mondiale montre que 40 % des céréales sont contaminées par des mycotoxines **(JOUANY et YIANNIKOURIS, 2002)**.

Les céréales peuvent être contaminées à plusieurs moments (en plein champ ou lors du stockage) **(PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)**. Ces toxines sont des métabolites secondaires élaborées par diverses moisissures (à faible poids moléculaire PM < 1000 Da). Elles sont très stables dans les milieux acides et aux températures élevées, peu solubles dans l'eau et difficilement métabolisées par les organismes vivants **(ADEBANJO et BANKOLE, 2003)**.

La présence de moisissures ne signifie pas nécessairement la formation de mycotoxines **(PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)**. Il existe des souches produisant des mycotoxines et des souches qui n'en produisent pas ou peu. La plus dangereuse de ces mycotoxines est l'aflatoxine B1 (AFB1) à cause de ces dégâts pathologiques sévères, elle est produite par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parasiticus* **(GODON et LOISEL, 1997)**.

Les mycotoxines possèdent des effets aigus à court terme ainsi que des effets à long terme **(MOLL et MOLL, 1995)**. Elles peuvent être ingérés, inhalés ou absorbés par la peau humaine. On y trouvera globalement des activités hémorragiques, immunotoxiques, hépatotoxiques, néphrotoxiques, neurotoxiques, oestrogéniques, tératogène ainsi que des effets mutagènes et cancérogènes **(ADEBANJO et BANKOLE, 2003)**.

Les mycotoxines sont produites par 5 genres de champignons : *Aspergillus, Penicillium, Fusarium*, *Claviceps et Alternaria*. Plusieurs sortes de mycotoxines peuvent se retrouver dans les denrées alimentaires **(MILLER et TRENHOLM, 1994)**. Le tableau 04 représente les moisissures et les mycotoxines retrouvées dans divers aliments.

Tableau 04. Moisissures et mycotoxines retrouvées dans certains aliments (MOLINIE et *al*., 2005).

Denrées alimentaires	Espèces toxiques	Mycotoxines probables
Blé, Farine, pain, maïs, chips.	*Aspergillus flavus, A ochraceus, Penicillium, Fusarium.*	Aflatoxines, Ochratoxine, Fumonisine.
Viande, viande cuite, fromage.	*Aspergillus flavus, Penicillium roqueforti.*	Aflatoxines, Acide pénicillique.
Pomme et produits dérivés de pomme.	*Penicillium expansum.*	Patuline.

II. 1.1. Aflatoxines

a- Définition et structure chimique

En 1965, l'aflatoxine était la première mycotoxine isolée et caractérisée. Elle présente le profil toxicologique le plus sérieux et le plus célèbre**.** Par la suite, des dérivés secondaires de l'AFB1 ont été identifiés tels que AFB2, AFG1, AFG2 et AFM1 **(PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)**. Leurs structures sont représentées dans la figure 02.

b- Propriétés physico-chimiques des Aflatoxines

Les mycotoxines sont peu soluble dans l'eau mais très solubles dans les solvants organiques**.** Les aflatoxines sont dégradées par l'ammoniaque et l'hypochlorite de sodium en formant des composés toxiques **(COLE et COX, 1981)**. Le Poids moléculaire (PM), facteur de rétention (RF) calculé sur gel de silice 60 (0.25 mm), points de fusion et spectre d'absorbtion sous Ultra-Violet des aflatoxines sont résumés dans le tableau 05.

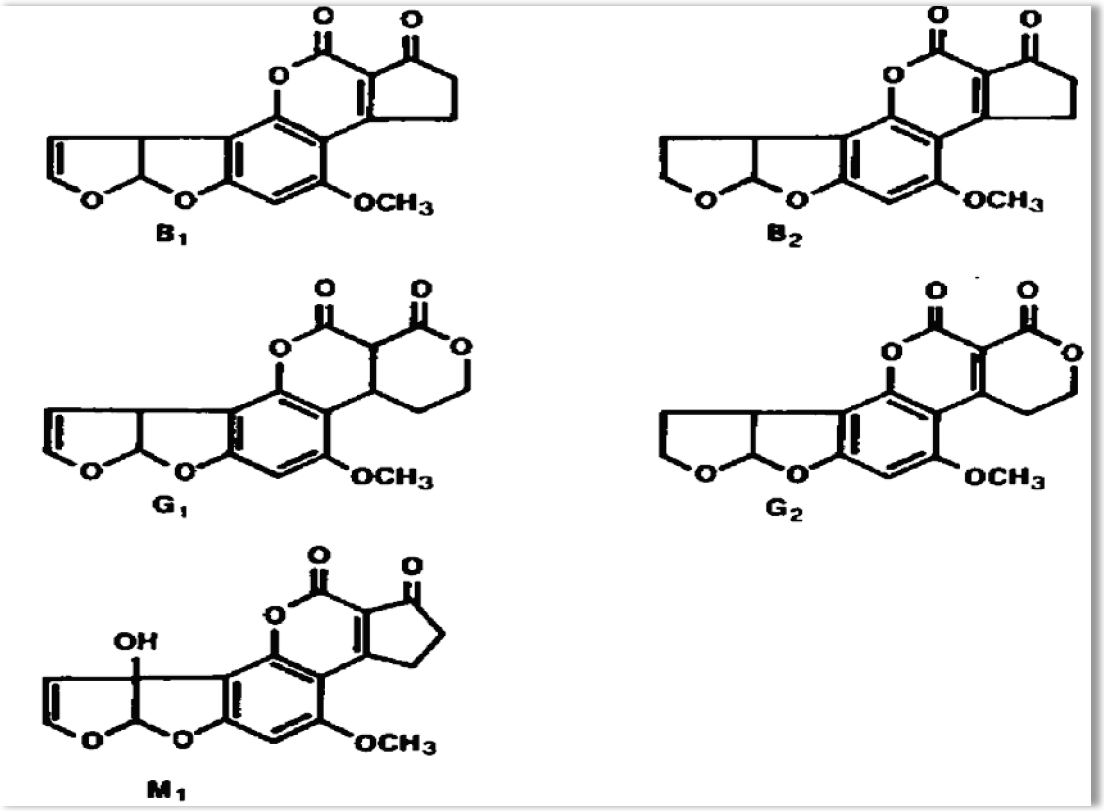


Figure 02. Structure chimique des aflatoxines (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999).

Tableau 05. Propriétés physicochimiques des aflatoxines (PFOHL-LESZKOWICZ, 1999).

Aflatoxines		PM	RF	Point de fusion °C	Spectre	
Propriété	type				A_{max} (nm)	ε
- Cristaux fluorescents. - Ces couleurs de fluorescence sont à l'origine du nom des mycotoxines.	**B1**	312	0.56	268-269 (décomposition) (cristallisation dans le chloroforme).	223 265 362	25 600 13 400 21 800
	B2	314	0.53	287-289 (décomposition) (cristallisation dans un mélange de chloroforme et de pentane).	222 265 363	17 000 11 700 23 400
	G1	328	0.48	244-246 (décomposition) (cristallisation dans un mélange de chloroforme et de méthanol).	243 257 264 362	11 500 9 900 10 000 16 100
	G2	330	0.46	237-239 (décomposition) (cristallisation dans une solution d'acétate d'éthyle).	214 265 363	28 100 11 600 21 000
	M1	328	0.40	299 (décomposition) (cristallisation dans une solution de méthanol).	226 265 357	23 100 11 600 19 000

c- Profil toxicologique des aflatoxines

L'AFB1 est la plus toxique, suivie par ordre décroissant de toxicité par l'AFM1, l'AFG1, l'AFB2 et l'AFG2 **(BILGRAMI et SINHA, 1992)**. L'aflatoxine provoque des toxicités aiguës au niveau de cellules divulguées comme suit :

c1- Hépatotoxicité

Selon **NEWBERNE** et **BUTLER (1969)**, la toxicité chez le rat dépend de l'âge et du sexe. Les jeunes rats et les mâles sont plus sensibles que les femelles. L'AFB1 provoque une nécrose hépatique au niveau centrilobulaire. Le foie devient enflé, pâle, friable et hémorragique.

c2- Génotoxicité et Mutagénicité

L'adduction des aflatoxines au niveau cellulaire se fait, soit à l'ADN d'origine animale ou humaine, soit à des oligonucléotides. Le site privilégié d'adduction est la guanine **(KUMAGAI et *al.*, 1995)**. D'autres études effectuées sur le rat ont montré également que l'aflatoxine se lie à l'albumine plasmatique **(WILD et *al.*, 1986)**.

c3- Immunotoxicité

Les études ont démontré que des doses relativement importantes en aflatoxine (0,3 - 6 mg / kg de poids corporel), provoquent une dépression de la réponse immunitaire**.** L'AFB1 supprime l'activité du complément C4 et diminue la production des interleukines. Elle provoque aussi une hypoplasie du thymus **(PIER et *al*., 1980)**. Une exposition à de faibles doses chroniques d'AFB1 augmente la sensibilité de l'individu aux infections **(JAKAB et *al.,* 1994)**.

c4- Tératogénicité

Les aflatoxines sont tératogènes à une dose de 4mg/kg de poids corporel. Durant la gestation, elle conduit à une forte proportion de malformations, voire à des avortements. **(ARORA et *al.,* 1981)**.

c5- Effets antibactériens

L'AFB1 est considérée par plusieurs auteurs comme un antibiotique vu ses propriétés d'inhibition de la croissance bactérienne. L'AFB1 bloque la multiplication cellulaire chez les espèces sensibles à des concentrations létales. Alors qu'à des concentrations sublétales, elle produit des aberrations morphologiques et physiologiques **(JAKAB et *al.,* 1994)**. Les aflatoxines inhibent la croissance des bactéries par inhibition de la synthèse ou blocage de la réplication de l'ADN et par blocage de la synthèse protéique **(BILGRAMI et SINHA, 1992)**.

II. 1.2. Ochratoxines

a- Définition et structure chimique

L'ochratoxine A (OTA) est découverte pour la première fois chez *Aspergillus ochraceus* **(VAN DER MERVE et *al*., 1965)**. Elle est produite par deux genres fongiques : *Aspergillus* (*A. ochraceus, A. cabonarius, A. niger,* etc.) et *Penicillium* (*P. verrucosum, P. nordicum,* etc.). Il existe d'autres ochratoxines comme l'OTB qui est le dérivé non chloré de l'OTA et l'OTC qui est son ester éthylique. L'OTA est la plus répandue. Elle est plus toxique que l'OTB, mais moins virulente que l'OTC **(COLE et *al*., 2003)**. Leurs structures sont représentées dans la figure 03.

L'OTA est partiellement dégradée dans des conditions normales de cuisson **(MÜLLER, 1982)**. Elle est complètement dégradée par un traitement à l'hypochlorite de sodium (4%) **(CASTEGNARO et *al.*, 1991)**.

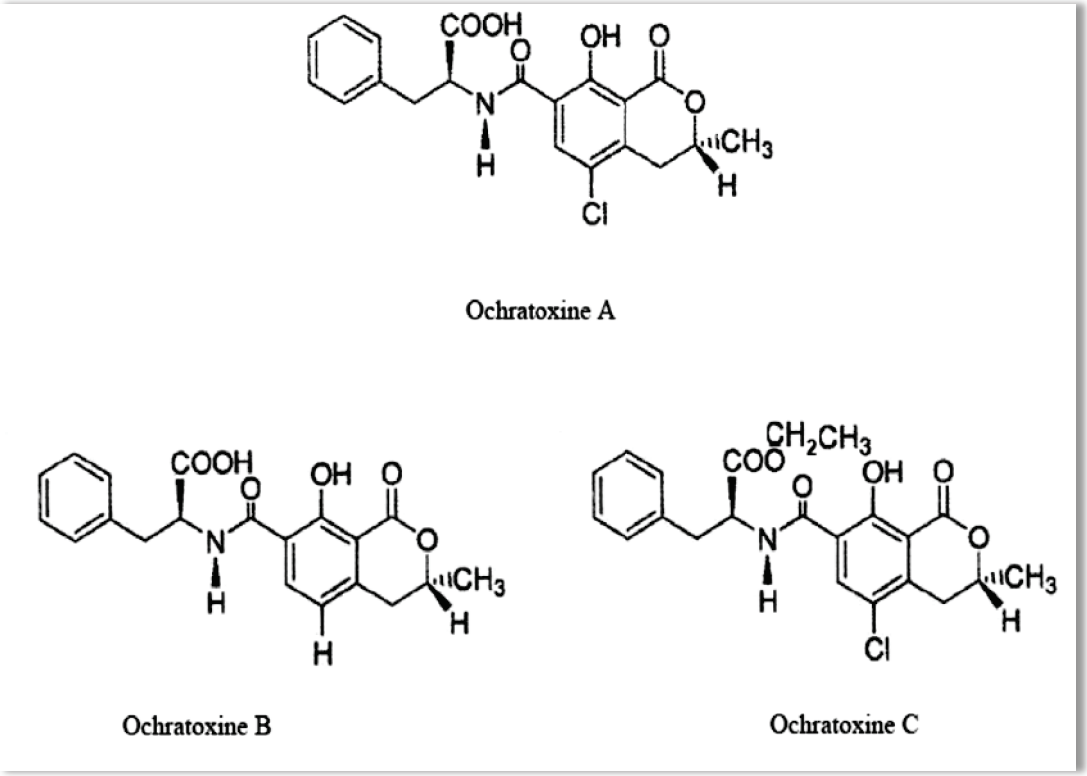


Figure 03. Structure chimique des ochratoxines (COLE et *al*., 2003

b- Propriétés physico-chimiques de l'ochratoxine A

L'OTA est un acide organique faible à une masse molaire de 403,8 g et de structure cristalline variant de l'incolore au blanc. Elle possède une intense fluorescence en lumière UV, de couleur verte en milieu acide et bleue en milieu alcalin **(MILLER et TRENHOLM, 1994)**.

L'OTA est soluble dans les solvants organiques polaires (alcools, cétones, benzène, chloroforme) mais faiblement soluble dans l'eau et insoluble dans l'éther de pétrole et les hydrocarbures saturés. Cette molécule possède un point de fusion proche de 90ºC. Ce point s'élève à 169ºC lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène **(IARC, 1993)**.

L'ochratoxine possède une stabilité élevée, elle est résistante à l'acidité et aux hautes températures. Ainsi, une fois contaminées, les denrées alimentaires peuvent difficilement être débarrassées de cette molécule. l'OTA peut résister pendant 3 heures à un autoclavage de 121ºC **(TRIVEDI et *al.,* 1992)**, même à 250°C, sa destruction n'est pas complète **(BOUDRA et *al.,* 1995)**.

c- Profil toxicologique de l'ochratoxine A

c1- Néphrotoxicité

La néphropathie est l'effet toxique majeur de l'ochratoxine A. Cette molécule est potentiellement néphrotoxique chez tous les mammifères non ruminants **(RIBELIN et *al.,* 1978)**. Des études épidémiologiques effectuées au Danemark, ont montré que l'OTA joue un rôle majeur dans l'étiologie de la néphropathie porcine **(ELLING et *al.,* 1985)**.

c2- Génotoxicité

L'OTA a longtemps été considérée comme génotoxique. Les tests de mutagénicité donnant des résultats positifs. D'autres travaux publiés confirment que l'activité cytotoxique de l'OTA conduirait à des lésions de l'ADN **(HENNING et *al.,* 1991)**.

c3- Immunotoxicité

L'OTA présente, dans certaines conditions, un effet immunosuppresseur puissant. Cet effet est observé à faible ou à forte dose. Des nécroses des tissus lymphoïdes ont été rapportées, indiquant la grande sensibilité de ces tissus à l'OTA, mais aussi une atteinte de l'immunité humorale et cellulaire a été mise en évidence **(CREPPY et *al.,* 1991)**.

c4- Tératogénicité

L'administration d'OTA chez l'animal est tératogène. Elle peut traverser le placenta et provoque des anomalies morphologiques diverses chez les embryons de rat, souris, porc et poulet **(PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)**. Toutefois, la gravité des malformations dépend de la voie d'administration et de la période gestative.

c5- Neurotoxicité

Chez le rat, l'administration d'OTA (pendant la période de gestation) induit des malformations du système nerveux central. De même, les chercheurs ont rapporté que l'OTA peut être considérée comme cause possible de certaines lésions ainsi que des dégâts au niveau cérébral. Cette substance s'avère donc hautement toxique pour les cellules nerveuses et aptes à atteindre le tissu neural (cerveau, rétine) **(PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)**.

c6- Cancérogenèse

Plusieurs études ont porté sur le développement de cancers expérimentaux chez des animaux nourris pendant quelques semaines avec des doses d'OTA variables. Il s'agit de tumeurs hépatiques mais surtout rénales **(HUFF et *al.*, 1992 ; ESKOLA, 2002)**.

II. 2. Ecotoxigénèse

Les mycotoxines peuvent être produites à tous les stades de la chaîne alimentaire depuis le champ jusqu'au produit fini. La mycotoxine peut aussi être présente alors que l'agent responsable a disparu, soit du fait de l'évolution de la mycoflore, soit du fait des traitements technologiques. La sécrétion par les moisissures de métabolites toxiques dans les aliments dépend de plusieurs facteurs qui peuvent être intrinsèques (nature de la souche) ou bien extrinsèques (conditions de l'environnement) **(PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)**.

II. 2.1. Biosynthèse des mycotoxines

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires synthétisées après les stades de multiplication et de croissance. D'après **STEYN (1998)**, les aflatoxines sont formées à partir des polycétoacides (Figure 04). Selon un processus complexe, l'ergotamine est formée à partir des peptides et des acides aminés. L'ochratoxine A est bio-synthétisée à partir de la phénylalanine et le dihydroisocoumarine **(LEYRAL et VIERLING, 2001)**.

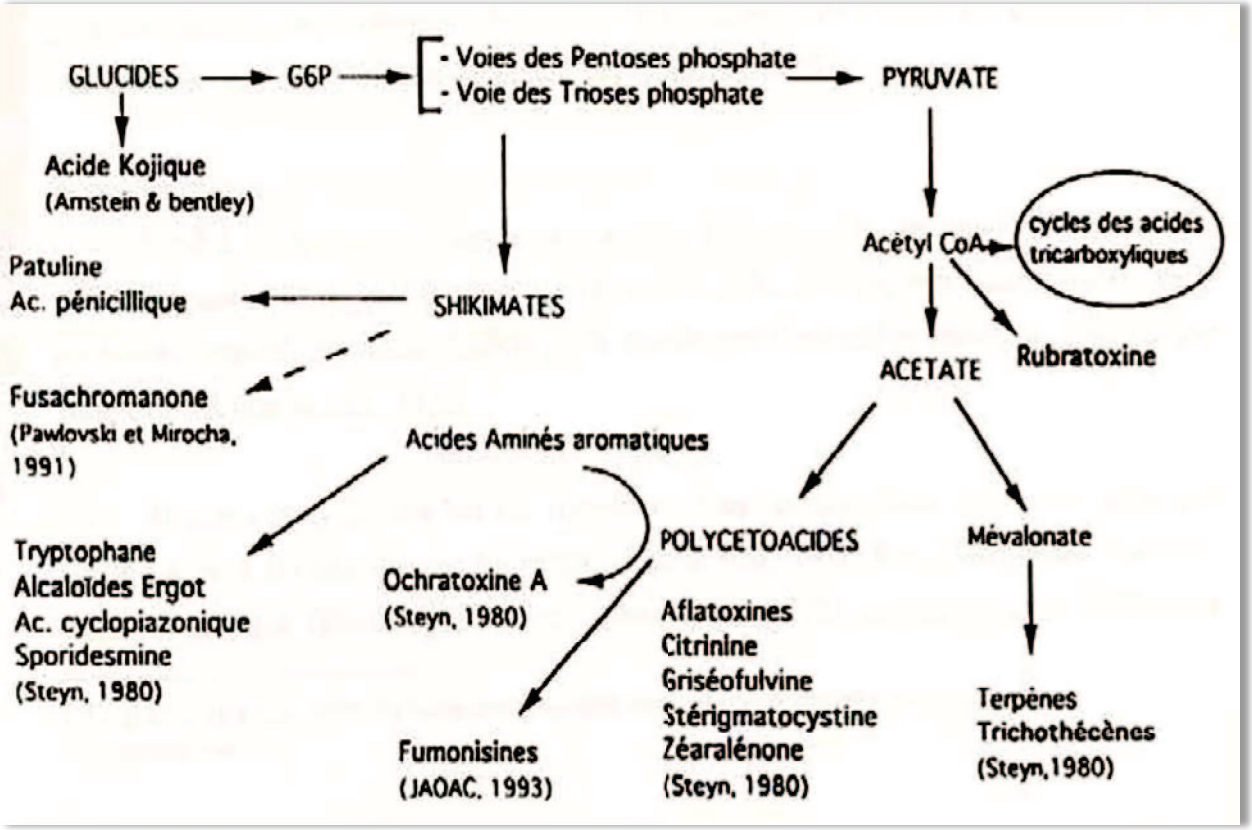


Figure 04. Voies de biosynthèse des mycotoxines (LEYRAL et VIERLING, 2001).

II. 2.2. Facteurs de biosynthèses

a- Facteurs physiques (facteurs extrinsèques)

Les principaux facteurs physiques constituent l'ensemble des conditions environnementales telles que ; la température, la disponibilité en eau, l'infestation par les insectes et l'attaque des rongeurs **(MIRETE et *al.,* 2004)**.

a1- Température

La température joue un rôle prépondérant sur la croissance et la physiologie des moisissures et en outre sur la compétition entre les espèces. La plupart des champignons sont mésophiles avec des optima de croissance variant de 25 ºC à 35ºC. Pour d'autres, ils sont psychrophiles ou psychrotolérantes **(BOTTON et *al.,* 1990)**.

La température permettant une toxigénèse optimale est en général voisine de la température optimale de croissance **(PFOHL-LESZKOWICZ, 1999)**. Par ailleurs, les mycotoxines peuvent être élaborées à des températures généralement inférieures à celle de la croissance **(SAMSON et *al.*, 2004)**. En ce qui concerne les *Aspergillus* de la section *Nigri*, de façon générale, la production d'OTA se fait dans un très large intervalle de température **(ESTEBEN et *al.,* 2004)**.

a2- Activité de l'eau (A_w)

Quelle que soit la nature de l'aliment, aucun micro-organisme ne peut se développer à une A_w inférieure à 0.65. Il s'agit d'un paramètre dont l'influence est déterminante sur le développement des moisissures ainsi que sur la production de mycotoxine **(BELLI et *al.,* 2004)**. Le tableau 06 résume l'A_w optimale pour la croissance de certaines espèces de champignons.

Tableau 06. Activité de l'eau optimale pour la croissance de certaines espèces d'*Aspergillus sp* et *Penicillium sp* (BELLI et *al.,* 2004).

Espèces fongiques	A_w (minimale)	A_w (maximale)
Aspergillus niger	0.90	0.98
Aspergillus ochraceus	0.83	0.87
Aspergillus parasiticus	0.82	0.98
Penicillium flavus	0.84	0.99

a3- pH

Le pH du milieu est un facteur important pour la croissance des moisissures et la production des mycotoxines. La plupart des moisissures croissent dans des pH acides et peuvent tolérer des valeurs de pH très basses **(LE BARS et LE BARS, 1987)**.

a4- Endommagement des graines

Les grains cassés, fissurés ou altérés par les insectes et les acariens constituent des foyers favorables pour le développement des moisissures qui, après leur envahissement libèrent les toxines **(LE BARS et LE BARS, 1987)**.

b- Facteurs chimiques (facteurs extrinsèques)

b1- Composition gazeuse

La plupart des moisissures sont aérobies. La réduction de la pression partielle en oxygène et surtout l'accroissement de la teneur en CO_2 a un effet dépresseur important sur la toxigénèse **(DERACHE, 1986)**. Toutefois, après conservation dans une atmosphère confinée, la remise à l'air libre ou la ventilation provoque rapidement une intense toxigénèse **(LE BARS et LE BARS, 1987)**.

b2- Traitements agricoles

La production des mycotoxines dans le champ peut être influencée par le labour, la rotation de récolte, les fongicides utilisés, la variété de la plante et les différences géographiques **(LE BARS et LE BARS, 1987)**.

b3- Nature du substrat

La toxigénèse dépend beaucoup plus étroitement de la denrée sur laquelle les moisissures se développent. Sur une denrée alimentaire, on trouve souvent une espèce dominante et donc ses toxines. Cependant, en général, la biogénèse des aflatoxines et de l'OTA, est favorisée tout d'abord par la présence des glucides dans le substrat, puis des lipides et enfin la présence des protides **(LUND et FRISVARD, 2003)**.

c- Facteurs biologiques (facteurs intrinsèques)

Les facteurs biologiques peuvent être liés à l'espèce fongique, à la spécificité de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques. Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces quelque fois appartenant à différents genres et une même espèce peut produire plusieurs mycotoxines.

De plus, la présence de plusieurs espèces fongiques sur la même denrée a généralement un effet dépressif sur la production de toxine. Cela s'explique d'une part, par la compétition pour le substrat et d'autre part, par le fait que certaines souches peuvent dégrader la toxine **(LE BARS et LE BARS, 1987)**.

II. 3. Métabolisme des aflatoxines dans l'organisme

Une fois dans l'organisme, l'AFB1 subit plusieurs réactions d'élimination à plusieurs niveaux. Ainsi dans la cellule hépatique, l'aflatoxine est métabolisée par un arsenal enzymatique qui facilite son élimination par augmentation de ses propriétés hydrophiles **(FREMY, 1982)**. La figure 05 illustre les différentes réactions de biotransformations de l'AFB1 dans l'organisme humain.

Il existe deux méthodes d'élimination de l'AFB1. Le processus d'hydroxylation qui constitue la voie principale et qui conduit à la formation du dérivé hydroxylé de l'aflatoxine B1 qui est l'aflatoxine M1. Alors que par oxydoréduction, il y a formation de l'aflatoxicol qui est moins toxique et de pouvoir mutagène faible. D'autres aflatoxines peuvent être formées à partir de AFB1, il s'agit notamment des aflatoxines B2a, H1, P1 et Q1 **(JAQUET et *al*., 1982)**.

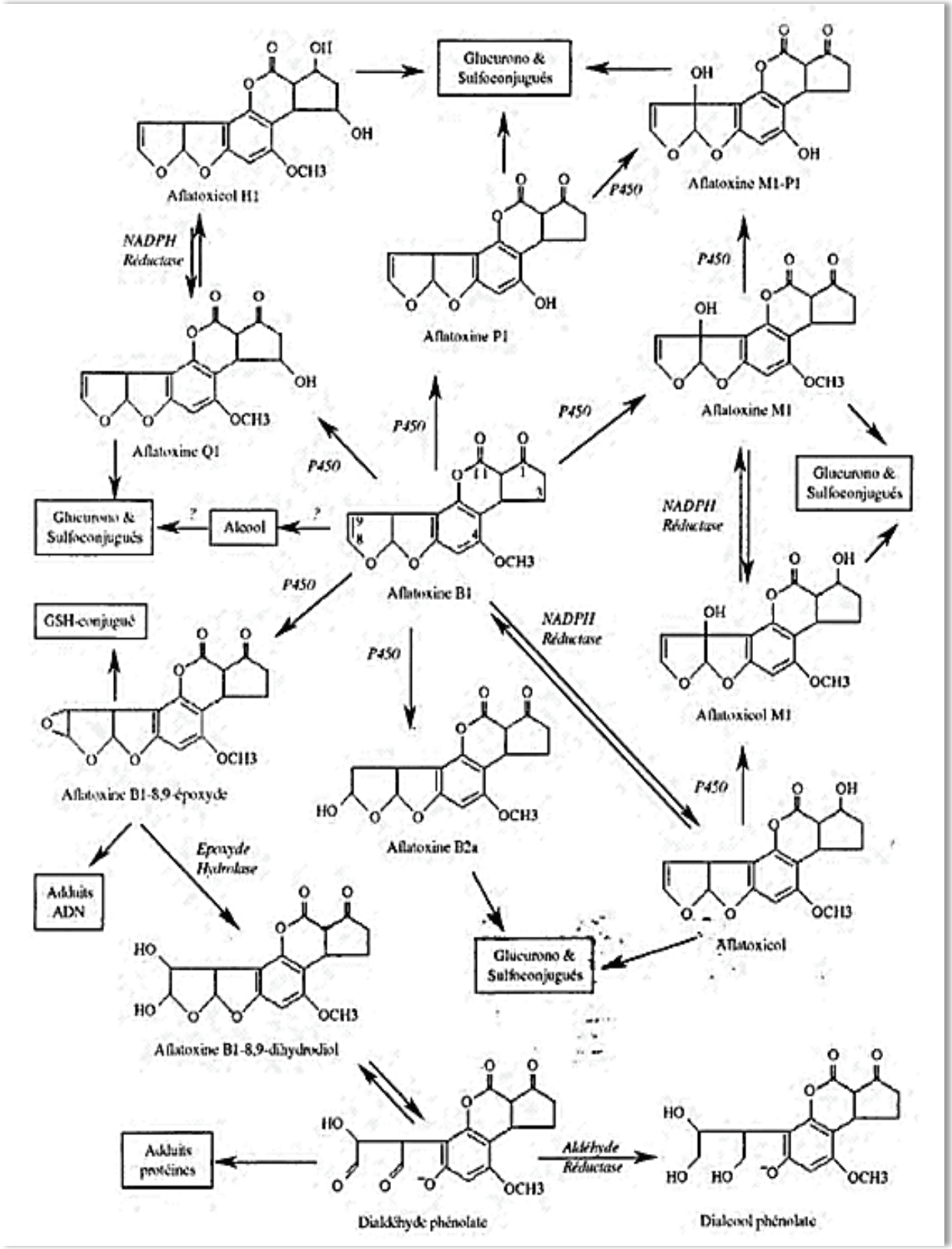


Figure 05. Biotransformation de l'aflatoxine dans l'organisme humain (RICHARD, 1998).

Généralités sur les plantes médicinales.

III. Généralités sur les plantes médicinales

Les plantes médicinales étaient employées pendant des siècles comme remèdes pour les maladies humaines parce qu'elles contiennent des composants de valeur. Récemment, le développement de la résistance microbienne aux antibiotiques disponibles ainsi que les effets secondaires négatifs infligés par les drogues modernes a mené les chercheurs à étudier l'activité antimicrobienne des plantes médicinales **(GARNERO, 1991)**.

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie, en alimentation, en cosmétologie et en pharmacologie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui sont surtout utilisés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche est orientée vers la découverte de nouvelles molécules bioactives, ou des matières premières pour la semi synthèse **(BAHORUN, 1997)**.

III. 1. Facteurs de variabilité des substances bioactives dans les plantes médicinales

III. 1.1. Influence du cycle végétatif

Des variations importantes peuvent se produire au cours du cycle végétal autant en ce qui concerne le rendement et la composition chimique des substances bioactives **(GARNERO, 1991)**.

III. 1.2. Influence des facteurs extrinsèques

Il s'agit de l'incidence des facteurs de l'environnement tels que la température, l'humidité relative, la durée totale d'insolation, le régime de vents exercent une influence directe et les pratiques culturales (l'apport d'engrais et le régime hydrique) **(BRUNETON, 1999)**. Les facteurs géographiques et édaphiques influencent aussi la composition des substances bioactives **(GARNERO, 1991)**.

III. 1.3. Influence de la récolte du matériel végétal

Le ramassage du matériel végétal pose très souvent un problème de contamination par d'autres espèces végétales surtout s'il s'agit de plantes à croissance rapide ou de végétaux qui poussent dans des lieux où se trouvent de nombreuses autres espèces végétales **(GARNERO, 1991)**.

III. 1.4. Influence des transformations du matériel végétal

Le matériel végétal qui va subir l'extraction n'est pas toujours traité immédiatement. Des modifications physiques et biochimiques dues à l'action de l'air, du soleil et l'échauffement en tas peuvent se produire et se révéler fâcheuses pour la qualité de l'extrait, surtout s'il s'agit de fleurs **(GARNERO, 1991)**.

III. 1.5. Influence des hybridations

Les hybridations introduisent l'hétérogénéité dans un peuplement végétal. Une race chimique peut apparaître par mutation. Ce cas a «été signalé avec l'exemple du Houblon (*Humulus lupulus* L) » **(GARNERO, 1991)**.

III. 1.6. Influence du procédé d'obtention

La labilité des constituants de la plante explique que la composition du produit obtenu par les méthodes d'extractions, est différente de celle du mélange initialement présent dans les organes sécréteurs du végétal. Au cours de l'extraction, l'eau, l'acidité et la température peuvent induire des réarrangements, des isomérisations, des racémisations et des oxydations. **(BRUNETON, 1999)**.

III. 2. Présentation de la coloquinte

La coloquinte (*Citrullus colcoynthis L*. Schard, Linnaea 12 : 414 (1838)) vraie est une plante herbacée vivace de la famille des Cucurbitacées. Elle est cultivée dans les pays tropicaux comme plante médicinale pour la pulpe de ses fruits, qui est amère et toxique **(SINCICH, 2002)**.

III. 2.1. Noms vernaculaires

Arabe : Handal, Hadag, Handhal ; Hantal, Hadjj. **Berber :** Taberka, Tefersite, Tadjellet. **Français :** coloquinte, chicotin. **Anglais :** Colocynth, bitter apple, bitter gourd. **Allemand :** Bitterzitrulle, Bitterapfel. **Inde :** Tumba ou Gartoomba. **Italien :** coloquintida, popone amaro coloquinte **(SINCICH, 2002)**.

III. 2.2. Taxonomie

Règne	Végétale
Sous règne	Plantes vasculaires
Super division	Spermaphytes
Division	Angiospermes
Classe	Dicotylédones
Sous classe	Dialypétales
Ordre	Violales
Famille	Cucurbitacées
Genre	*Citrullus*
Espèce	*Citrullus colocynthis* **(ZORO et *al.*, 2003).**

III. 2.3. Description morphologique

La coloquinte est une plante rampante herbacée, annuelle ou vivace. Les tiges sont angulaires, rugueuses, rampantes ou migrantes et rudes. Les feuilles de 5 à 10 cm de longueur, ont un limbe découpé en 5 à 7 lobes. Les fleurs jaune verdâtre, monoïques à sexes séparés, solitaires, apparaissent entre Mai et août à l'aisselle des feuilles. La corolle de couleur jaune comporte cinq lobes. Les fruits sphériques de 7 à 10 cm de diamètre, ressemblant à une petite pastèque, de couleur verte panachée de jaune clair, devient complètement jaune à maturité. La chair légère, spongieuse, de couleur jaune orangé. Une plante produit 15 à 30 fruits. Les graines de petite taille (6mm de longueur), ovoïdes et aplaties, lisse, de couleur variant de l'orange au brun noirâtre et ont une saveur amère **(DUKE, 1983)**. Les différentes parties de la plante sont illustrées dans la figure 06.

III. 2.4. Répartition géographique

La coloquinte, originaire des sols arides, est très fréquente dans les régions tropicales humides ou modérément sèches, elle est peu présente dans les zones tempérées **(BRUNETON, 1996)**. Elle occupe une région très vaste qui s'étend du Nord-Africain, du Sahara, Egypte, Arabie Saoudite jusqu'en Inde, ainsi que la région méditerranéenne (sud européen) **(BATANOUNY et *al.*, 1999)**.

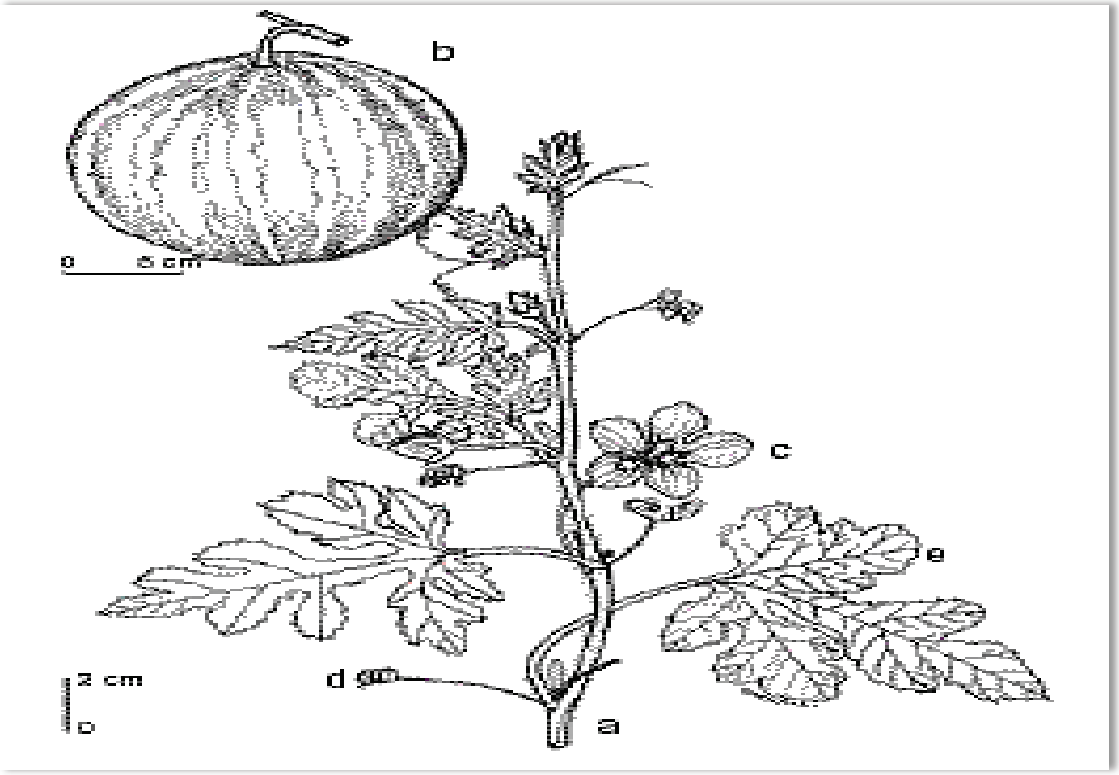


Figure 06. Schéma des différentes parties de *Citrullus Colocynthis* (ZORO et *al.*, 2003).

(a : rameau, b : fruit, c : fleur mâle, d : vrille, e : feuille)

III. 2.5. Actions thérapeutiques

Pendant des périodes bibliques, les fruits de la coloquinte ont été recueillis et considérés comme poison mortel. Ils sont largement répandus dans la médecine traditionnelle, car ils possèdent diverses propriétés thérapeutiques : purgatives, anti-tumorale et immunostimulant **(ABDEL-HASSAN et *al.,* 2000 ; BENDJEDDOU et *al.,* 2003)**, anti-inflammatoire et antioxydant **(AL-GHAITHI et *al.,* 2004 ; MARZOUK et *al.,* 2010)**, antirhumatismal **(BOUKEF et SOUISSI, 1982)**, laxative et contre les trouble urogénitaux, la leucémie, l'ictère la fièvre, l'ascite, les désordres biliaires et les hémorroïdes **(ZIYYAT et *al.,* 1997)**. Elle est aussi utilisée contre les maladies hépatiques **(GEBHARDT, 2003)**. L'extrait éthanolique du fruit de la coloquinte exerce un effet anti-microbien sur *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus epidermis* et un effet antifongique sur plusieurs genres de champignons **(GURUDEEBAN et *al*., 2010)**.

L'huile extraite à partir des graines est employée pour traiter des morsures de serpent et de scorpion, pour favoriser la croissance des cheveux et pour noircir les cheveux gris **(ROY et *al.,* 2007)**.

Plusieurs études ethno-pharmacologiques classent la coloquinte comme étant une plante traditionnelle utilisée pour traiter le diabète **(BNOUHAM et *al*., 2006)**. Une enquête ethnobotanique effectuée par **BENMEHDI** en **2000** sur 80 plantes traditionnellement utilisées pour traiter le diabète dans la région de Tlemcen (Algérie), révèle que la coloquinte est la plante la plus utilisée après le fenugrec.

III. 2.6. Composition chimique

Le screening phytochimique des différentes parties de la coloquinte (racines, tiges, graines et feuilles) a permis de caractériser les familles de composés chimiques existants dans la plante.

Les résultats d'examen phytochimique présentés par **BENMEHDI** en **2000**, montrent la présence des alcaloïdes dans toutes les parties de la coloquinte surtout dans les graines et l'épicarpe. Les stéroïdes et les tanins sont retrouvés dans toutes les parties, et à des quantités moindres les flavonoïdes et les saponines. Il a aussi mentionné que les coumarines, les anthracénosides, les anthraquinones, les ergolines et les émodols sont totalement absents **(BENMEHDI, 2000)**.

Les Graines de coloquinte contiennent 26,6% d'huile, 13,5% de protéine, 2,1% de cendre, 52,9% de fibre brute, 4,9% d'azote libre et contiennent 322 mg/100 g de potassium, 119 mg/100 g de phosphore et 3,3 mg/100 g de fer **(SAWAYA et *al.*, 1986)**. Elles contiennent aussi la phytosteroline, phytosterols, hydrocarbures, saponines, alcaloïdes, polysaccharides, glycosides et des tannins **(DUKE, 1978)**.

a- Flavonoïdes

Le terme flavonoïde rassemble une très large gamme de composés naturels appartenant à la famille des polyphénols. Leur fonction principale semble être la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles (au-delà de la chlorophylle, des caroténoïdes et des bétaïnes) **(BRUNETON, 1999)**. Tous les flavonoïdes ont une origine biosynthétique commune et possèdent le même élément structural de base. Elles se divisent généralement en cinq classes : flavonols, flavones, anthocyanidines, flavonones et chalcones **(PETERSON, 1998)**.

Les fruits de la coloquinte contiennent trois flavonoïdes : 3'-méthoxy-iso-orientine, iso-orientine et iso-vitexine. Les feuilles contiennent aussi trois flavonoïdes : 8-C-*p*-hydroxybenzoyl- iso-vitexine, 6-C-*p*-hydroxylvitexine et 8-C-*p*-hydroxybenzoyl-iso-vitexine 4'-o-glucoside **(MAATOOQ et *al.*, 1997)**.

b- Saponosides

Les Saponosides constituent un vaste groupe d'hétérosides très fréquents chez les végétaux. Ils sont caractérisés par leurs propriétés tensioactives. Ils se dissolvent dans l'eau en formant des solutions moussantes. La plupart des saponosides présentent des propriétés hémolytiques **(SEGER et *al.*, 2005)**.

Les saponosides peuvent être classés en deux groupes selon la nature de leur génine: Saponosides à génine stéroïdiques et Saponosides à génine triterpéniques **(BRUNETON, 1999)**. Au niveau de la coloquinte quatre triterpènes tetra cyclique ont été isolés à partir du fruit : 2-O-B-D glucopyranosylcucurbitacins I, J, K et L **(SEGER et *al.*, 2005)**.

c- Alcaloïdes

En plus de la choline qui est connue comme constituant des cucurbitacées, **DARWISH-SAYED et *al* (1973)**, a révélé la présence de trois autres alcaloïdes : (C_{10} H_{15} N O_3 et C_{20} H_{32} NO) considérés comme des dérivés de la pyridine, tandis que le troisième ($C_{16}H_{24}NO_7$) a été suggéré être le dérivé de la pyridine ou de la quinoline.

Deuxième partie : étude expérimentale.

Matériel et méthodes.

I. Matériel et méthodes

I. 1. Matériel végétal

I. 1.1. Blé tendre local et importé

Les échantillons de blé tendre local et importé sont prélevés le mois de décembre 2010 au niveau des silos en béton armé situés au sein de l'OAIC (office algérien interprofessionnel des céréales) de la wilaya de Saida (Photo 01) (Figure 07).

I. 1.2. Fruit de *Citrullus colocynthis*

Les fruits maturé de *Citrullus colocynthis* proviennent de Oued N'sa situé à environ 70 km de la ville de Ouargla (Photo 02) (Figure 07).

Les dates, les lieux d'échantillonnages, le nombre et le poids des échantillons étudiés sont consignés dans le tableau 07.

Tableau 07. Origine et date de prélèvement des échantillons.

Echantillons	Date de prélèvement	Lieu du prélèvement	Nombre d'échantillon	Quantité de chaque échantillon (g)
Blé tendre local	29/12/2010	OAIC (Saida)	01	3000
Blé tendre importé	29/12/2010	OAIC (Saida)	01	3000
Fruit de *Citrullus colocynthis*	19/12/2010	Oued N'sa (Ouargla)	70	500

L'identification botanique des espèces végétales est effectuée au niveau du laboratoire de physiologie végétale à l'université de Saida par Monsieur Dr. Hasnaoui sur l'appui de son expérience et de certaines documentations relatives à la taxonomie de cette espèce au sein du règne végétal, telles que la 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.

I. 2. Matériel fongique

Les souches fongiques utilisées pour tester l'activité biologique des extraits ont été isolées, à partir du blé tendre local et importé, purifiées et identifiées. Il s'agit d'*Aspergillus flavus, d'Aspergillus ochraceus, d'Aspergillus niger* et *d'Aspergillus fumigatus.*

Photo 01. Siège de l'office algérien interprofessionnel des céréales de la wilaya de Saida.

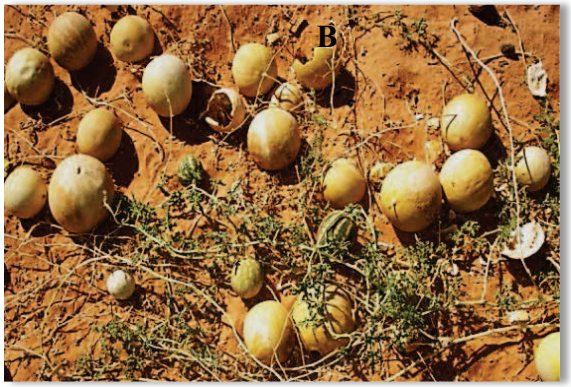


Photo 02. Fruit de *Citrullus colocynthis.*

Figure 07. Situation des différentes stations de prélèvements des échantillons (Encarta, 1998).

I. 3. Méthode d'échantillonnage

I. 3.1. Précautions d'échantillonnage

Avant toute analyse, il convient de prélever un échantillon représentatif du produit à analyser. Néanmoins, les techniques de prélèvements habituellement recommandées pour d'autres analyses ne sont guère probantes quand il s'agit d'analyses microbiologiques. En général, sur les produits secs, granuleux et pulvérulents, la microflore est toujours repartie de façon très hétérogène **(DUNOYER, 1989).**

A ce titre, il faut noter que les résultats des examens microbiologiques n'ont de valeur que si certaines précautions d'échantillonnage ont été respectées :

- Prises d'échantillons avec des instruments stériles ;
- mise de l'échantillon dans des récipients ou sachets stériles ;
- respect des règles d'hygiène générale pour la personne effectuant le prélèvement ;
- rapidité de l'acheminement des échantillons dans l'attente de leurs analyses ;
- conservation des échantillons dans un endroit frais et sec (8 à 15°C) mais jamais à des températures négatives **(DUNOYER, 1989).**.

SUTRA et ***al*** **(1998),** stipulent que les échantillons doivent être prélevés rigoureusement au hasard, en évitant les biais (par exemple, éviter des prélèvements "systématiques" en début ou en fin de production).

La répartition très hétérogène des mycotoxines dans le champ, dans les silos et dans les graines elles-mêmes laisse entrevoir des doutes sur les résultats de dosage et de détection de ces toxines. Ces doutes proviennent de l'échantillonnage. À cet égard, **UGRINOVITS et ZUCKERANALYSEN (2002)**, recommandent de constituer un échantillon de grain assez grand, à partir des divers petits prélèvements dans la masse en mouvement. **MULTON (1982),** ajoute que bien des fois la préparation de l'échantillon est laissée à l'appréciation de l'analyste.

Dans cette étude et afin d'avoir un échantillon représentatif, trois échantillons de blé tendre local et importé ont été prélevés au hasard. Les échantillons sont mélangés puis divisés en trois sous échantillons à masse égale. Ils sont ensuite transportés au laboratoire de l'université (dans des sacs en papier Kraft) où ils sont soumis à des analyses physicochimiques, microbiologiques et mycotoxicologiques.

I. 4. Etude de la qualité physicochimique, microbiologique et mycotoxicologique du blé tendre local et importé

I. 4.1. Etude de la qualité physicochimique du blé tendre local et importé

a- Détermination du pourcentage des grains brisés (état physique des grains)

Les atteintes mécaniques du grain durant le stockage sont favorables aux développements des champignons et à l'attaque des insectes. Les grains endommagés deviennent un terrain favorable à l'infestation et à la pénétration de l'inoculum d'*Aspergillus* et de *Penicillium* à l'intérieur de la graine**,** d'où l'importance de l'élimination des grains brisés. Il s'agit donc de comptabiliser les grains cassés par rapport à une prise d'essai de 100 grains représentative de chaque sous échantillon de blé tendre à analyser.

b- Détermination de l'humidité

C'est une méthode d'étuvage qui consiste à effectuer un séchage d'une prise d'essai de chaque sous échantillon à une température de 105 $\pm$ 2 °C jusqu'à l'obtention d'un poids constant.

L'humidité est mesurée par la formule :

$$\mathbf{H\% = ((P_0 - P_t) - (P_1 - P_t))/ (P_0 - P_t) \times 100.}$$

- **H%** : humidité en (%).
- $\mathbf{P_t}$: poids de la tare.
- $\mathbf{P_0}$: poids de la tare avec échantillon.
- $\mathbf{P_1}$: poids constant après séchage multiple.

c- Mesure du pH

Pour l'estimation de l'acidité ou l'alcalinité de nos échantillons, une solution est préparée à base de 45 ml d'eau distillée additionnée à 5 g d'échantillon. Après une heure de repos avec une agitation continue, la mesure du pH est réalisée à l'aide du pH mètre type (HANNA pH 209) **(MULTON, 1982)**.

I. 4.2. Etude de la qualité microbiologique du blé tendre local et importé

a- Dénombrement de la flore fongique

La méthode de dilution (ou méthode indirecte) consiste à dénombrer les microorganismes des grains de céréales mises en suspension avec 45 ml d'eau physiologique (le diluant) et quelques gouttes de Tween 80 (Figure 08).

L'intérêt de cette méthode réside dans le fait que les propagules fongiques sont dénombrées à partir de la même suspension mère et qu'elles intègrent la flore interne et externe **(MULTON, 1982).**

A partir de la dilution mère, des dilutions décimales sont réalisées pour chaque sous échantillon de variété de blé tendre prélevée (local et importé). Deux boites pour chaque dilution sont ensemencées avec 1 ml d'inoculum étalé en surface. L'incubation se fait à 25 ± 2°C pendant 5 à 7 jours (Figure 08). Trois milieux sont couramment utilisés pour le dénombrement de ces propagules fongiques :

- **PDAa** (Potatoes Dextrose Agar acidifié) ;
- **CDA** (Czapek Dextrose Agar) ;
- **DRBC** (Dichloran Rose Bengal Chloramphénicol).

Afin d'éviter la contamination bactérienne, le milieu PDA est acidifié jusqu'à un pH de 4,5 à 5 en ajoutant 1 ml d'acide lactique à 25% par flacon de milieu. On peut également utiliser le rose Bengale pour inhiber la croissance bactérienne et limiter la taille des moisissures dans la boite de Pétri ce qui facilite le comptage **(LARPENT, 1990).**

En vue de l'obtention d'isolats purs servant à l'identification des souches, plusieurs repiquages successifs sur milieu PDA acidifié ont été réalisés. Les isolats purs sont repris sur des tubes de PDA acidifié inclinés et incubés à 25 ± 2°C pendant une semaine ou plus. Ces tubes sont ensuite gardés à 4°C afin d'assurer leur conservation.

b- Identification des moisissures

L'identification fait essentiellement appel aux caractères culturaux et morphologiques des moisissures isolées à l'état pure **(BOTTON et *al.*, 1990)**.

- **Caractères culturaux :** ce sont les critères macroscopiques tels que la vitesse de croissance, texture et couleur du thalle, couleur du revers de la culture, odeur de l'exsudat et présence ou absence d'un pigment diffusible.

- **Caractères morphologiques :** c'est l'étude microscopique du mycélium, nature des organes différenciés et l'étude biométrique.

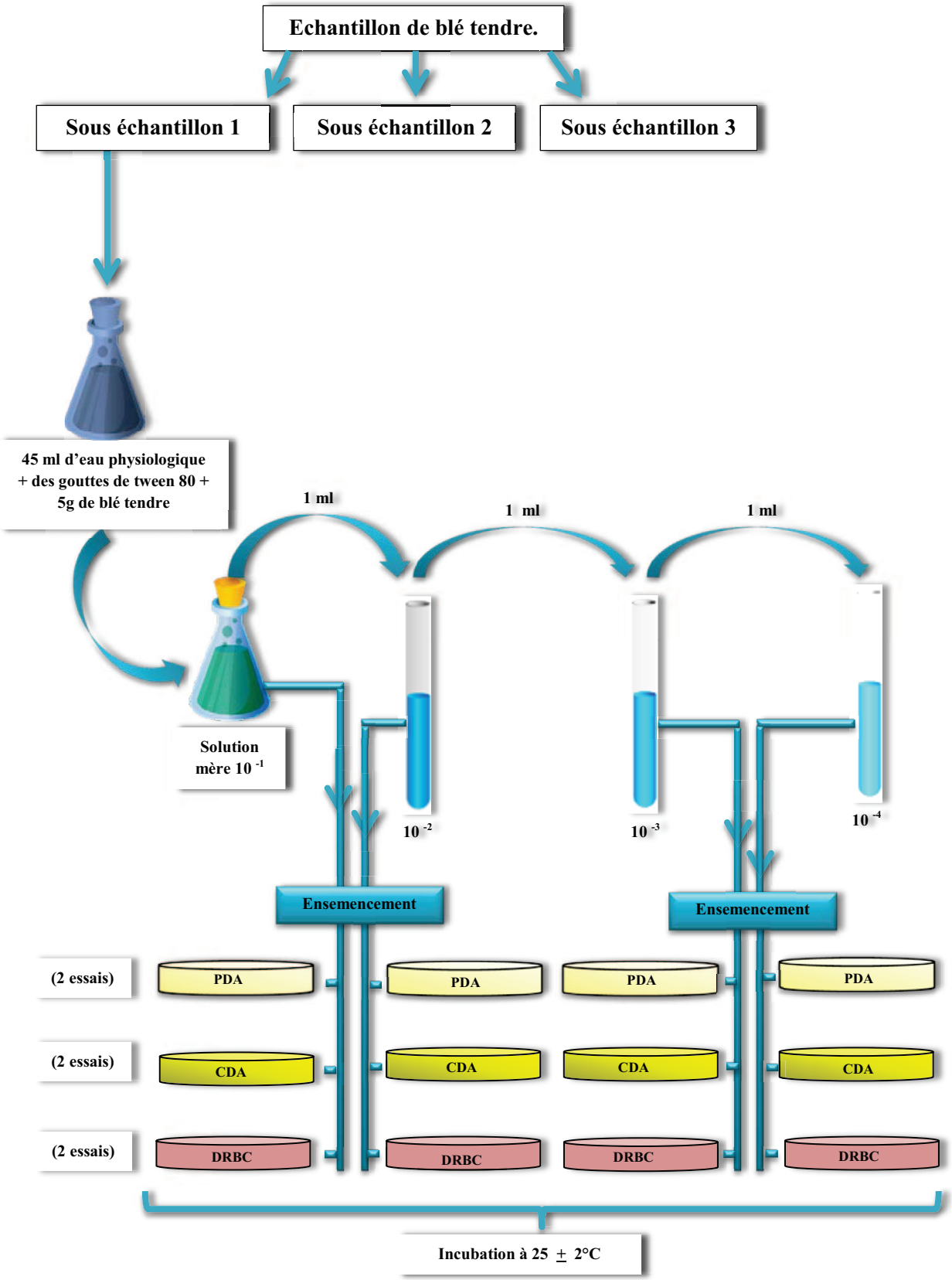


Figure 08. Techniques d'isolement et de dénombrement des souches fongique (LANSBOROUGH, 2004).

b1- Identification des genres de moisissures

α- Identification des genres par la technique de scotch

La technique de scotch consiste à adhérer à l'aide d'un bout de scotch une fraction mycélienne à partir d'une culture jeune et de la coller sur une lame contenant quelques gouttes de lactophénol (Photo 03) **(CHABASSE, 2002)**. Les observations microscopiques sont effectuées aux grossissements ×10, ×40 et ×100 à l'aide d'un microscope type (Motic digital microscope DMB série).

β- Identification des genres par la technique de micro-culture

Décrite par **HARIS (1989),** 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. Les spores sont ensemencées sur les limites périphériques du milieu pour leur fournir un potentiel d'oxygène élevé afin qu'elles puissent germer. L'ensemble est conditionné dans une chambre stérile et humide puis incubé à 25 ± 2°C pendant 3 à 5 jours (Photo 04).

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

b2- Identification des espèces *Aspergillus* et *Penicillium*

L'identification des espèces *Aspergillus* et *Penicillium* 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. A partir de cette suspension, différents milieux de cultures sont ensemencés.

α- Identification des espèces *Aspergillus*

L'identification des espèces *Aspergillus* se fait sur trois milieux de cultures différents à savoir :

- **MEA** (Malt Extract Agar) à 25 °C,
- **G25N** (Glycérol Nitrate Agar) à 25 °C,
- **CYA** (Czapek Yeast Agar) à deux températures différentes : 5°C et 37°C.

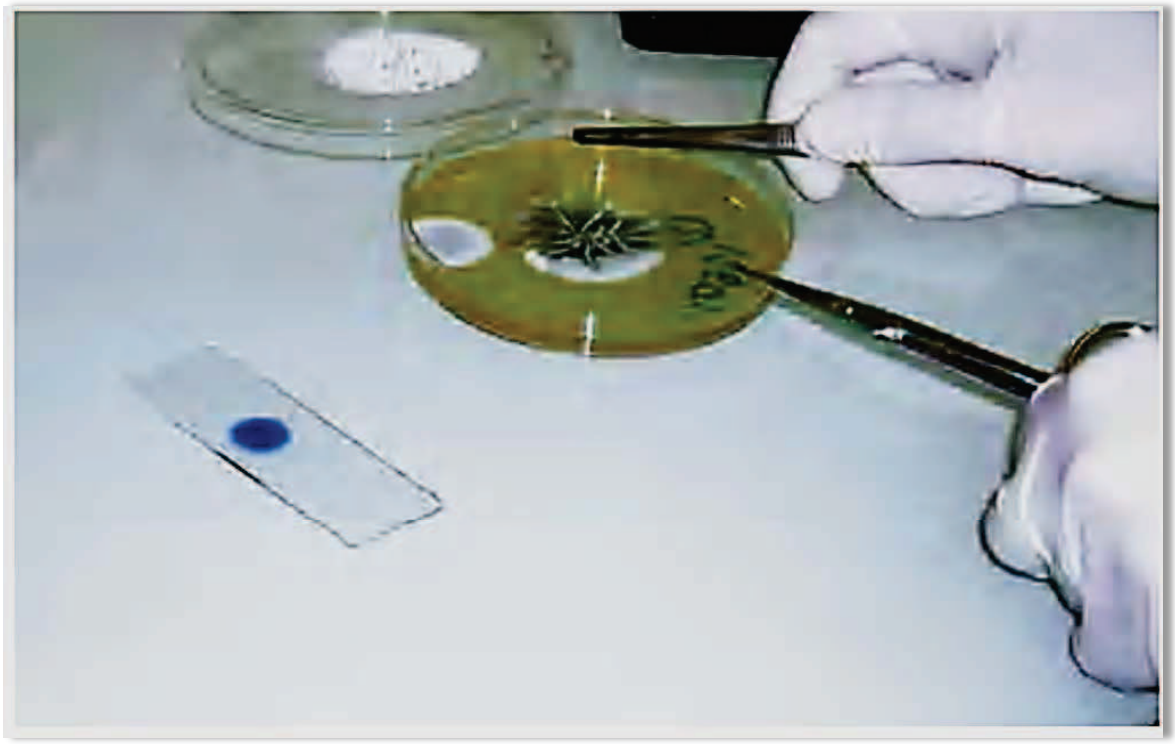


Photo 03. Méthode d'identification microscopique des moisissures (CHABASSE, 2002).

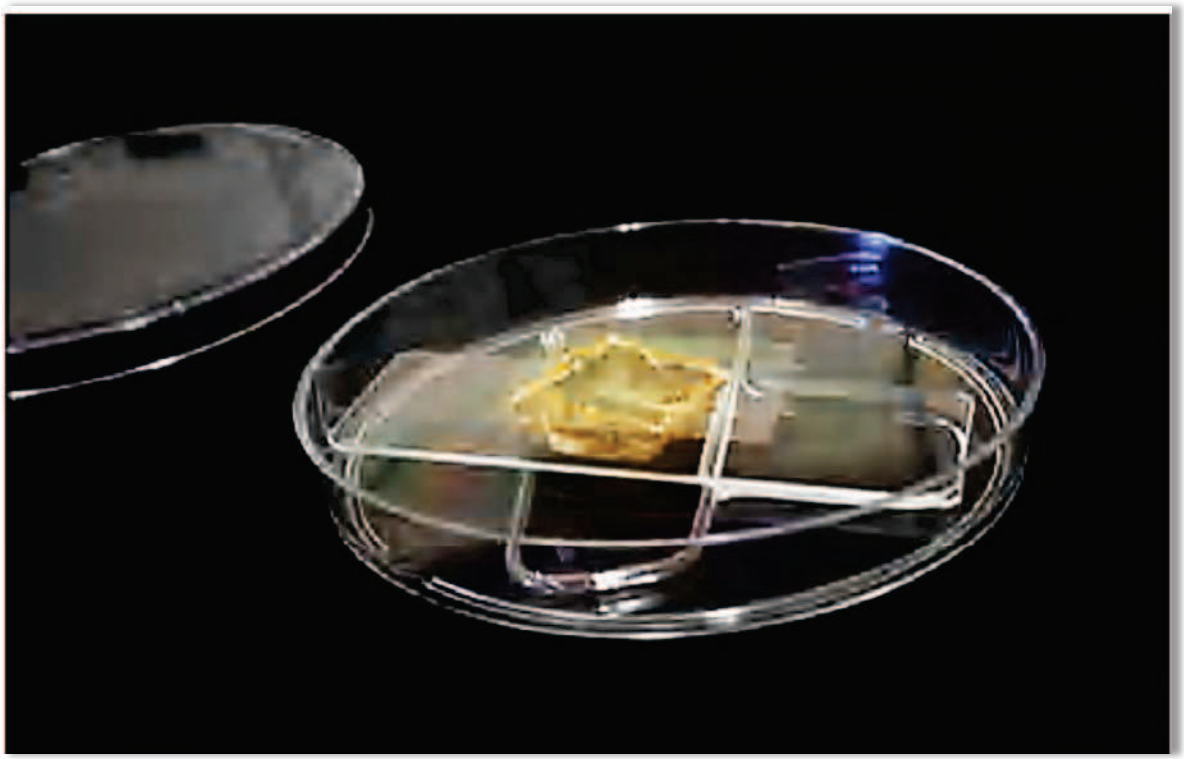


Photo 04. Micro-culture des moisissures pour l'identification microscopique (CHABASSE, 2002).

Inoculation se fait par dépôt centrale d'une goutte de la suspension préparée précédemment sur la surface des milieux de cultures solidifiés (Figure 09).

Une confirmation des souches présumées *Aspergillus flavus* et *Aspergillus parsiticus* est faite par une inoculation sur le milieu AFAP à 25°C. Ce dernier donne un revers de culture orange caractéristique à ce groupe.

β- Identification des espèces *Penicillium*

L'identification des espèces *Penicillium* se fait sur quatre types de milieux de cultures à savoir :

- **CDA** (Czapek Sucrose Agar) à 25 °C,
- **MEA** (Malt Extract Agar) à 25 °C,
- **G25N** (Glycérol Nitrate Agar) à 25 °C,
- **CYA** (Czapek Yeast Agar) à 37°C.

Ces milieux sont inoculés avec les différents isolats de *Penicillium* de la même façon que l'inoculation des différents isolats d'*Aspergillus* (Figure 10).

La lecture se fait après 7 et 14 jours d'incubation en se référant aux clefs d'identification de **PITT (1973)** et **RAMIREZ (1982).** Le CDA (milieu minéral à A_w élevée) et le G25N (milieu à base de glycérol à A_w faible) donnant une vitesse de croissance variant en fonction de l'A_w à une température constante de 25°C. Le CYA donne une croissance variant selon l'A_w à des températures variables de 5°C et 37°C. Le MEA informe sur la couleur du thalle à 25°C.

I. 4.3. Analyses mycotoxicologiques

Toutes les souches d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus ochraceus* identifiées à partir des prélèvements analysés sont cultivées sur milieu PDA acidifié pendant 5 jours à 25 ± 2°C pour pouvoir rechercher la capacité de ces souches à produire des mycotoxines.

a- Détection visuelle des souches productrices de mycotoxine

Les souches d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus ochraceus* sont réensemencées sur des boites de Pétri contenant 20 ml de milieu CEA (Coconut Extract Agar) et le désoxycholate de sodium à raison de 0,8%. Les boites de Pétri sont incubées à 25 $\pm$ 2°C pendant 3 à 7 jours. Des boîtes de Pétri en verre non fluorescent ont été utilisées. Les zones de diffusion d'aflatoxine et d'ochratoxine sont détectées en utilisant une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm **(LEMKE et *al*., 1989).**

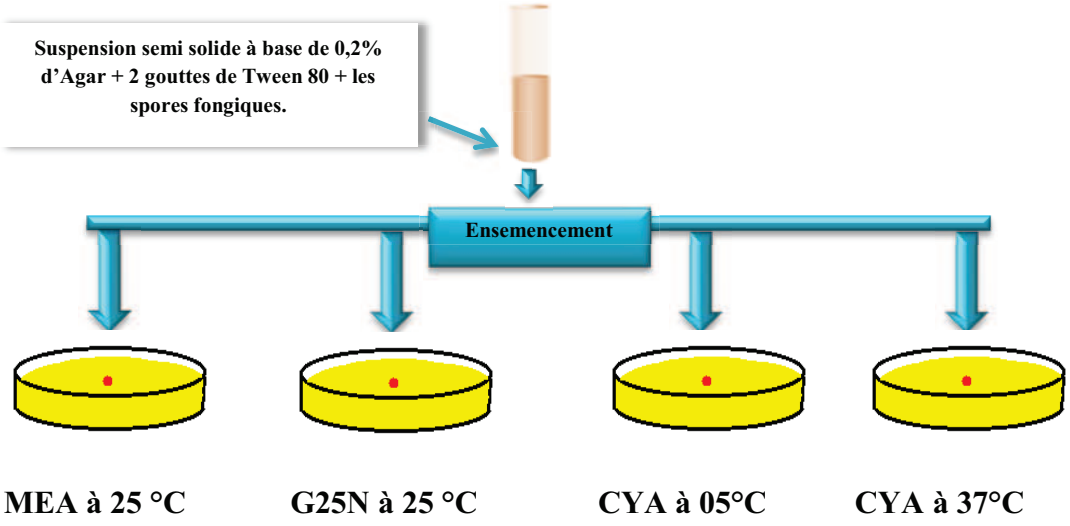


Figure 09. Inoculation des isolats d'*Aspergillus* (sur les différents milieux de cultures).

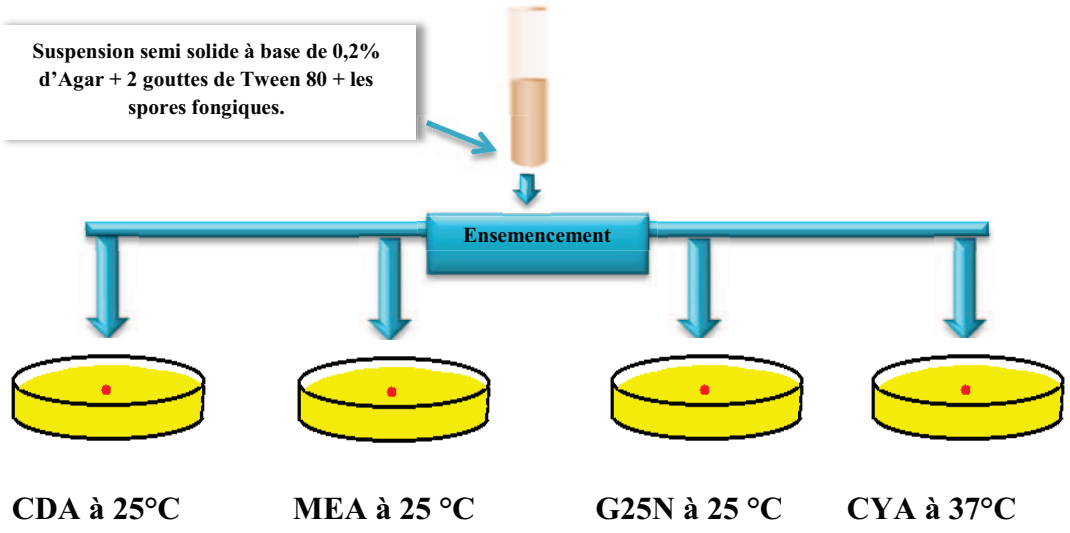


Figure 10. Inoculation des isolats de *Penicillium* (sur les différents milieux de cultures).

b- Détection des mycotoxines par la chromatographie sur couche mince (CCM)

Les souches d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus ochraceus* sont réensemencées séparément sur milieu YES (Yeast Extract Sucrose) ; riche en vitamines du groupe B complexes, ce milieu favorise la métabolisation secondaire et induit les réactions anabolisantes conduisant à la production des mycotoxines. L'incubation se fait à 27 ± 2 °C pendant 14 jours.

Après 14 jours d'incubation, la biomasse formée est éliminée en filtrant le milieu YES à travers du papier filtre type Wattman N° 01. Les 50 ml du filtrat obtenu sont additionnés à 100 ml de chloroforme, le mélange est rigoureusement agité pendant 10 min puis laissé décanter en utilisant une ampoule à décantation. Cette opération est répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant à la phase aqueuse récupérée à chaque séparation.

La phase chloroformique ainsi obtenue est filtrée sur du papier Wattman N° 01 puis concentrée par évaporation sous vide à l'aide d'un rotavapor type (Heidolph laborota 4000 efficient) jusqu'à l'obtention d'un volume de 2 à 3 ml (indice d'une évaporation achevée).

La chromatographie sur couche mince constitue la méthode de base qui permet une séparation efficace des mycotoxines et leur identification avec une bonne précision. Elle se fait sur une plaque de silicagel (gel de silice 60 F254) sur laquelle est déposé un spot de 20 µl et un autre de 40 µl de chaque extrait chloroformique concentré. 5 µl de chaque solution standard d'aflatoxine et d'ochratoxine sont déposés sur la même ligne droite (ligne de dépôt). La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un mélange de solvant d'élution constitué de toluène, acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (5 : 4 : 1) respectivement **(MULTON, 1982)**.

Après migration et évaporation du produit d'élution à sec, la plaque est examinée sous une lampe à UV à une longueur d'onde de 365 nm. La présence d'aflatoxine et d'ochratoxine se traduit par des fluorescences caractéristiques aux spots standards et d'un même RF (facteur de rétention) que l'étalon. La figure 11 résume les différentes étapes d'extraction des mycotoxines.

c- Détection des mycotoxines au niveau du substrat

A 50 g de chaque variété de blé tendre finement broyé sont additionnés 100 ml d'un mélange de solvants (chloroforme – méthanol V/V), le mélange est agité pendant 10 min, la phase liquide est séparée du culot par filtration. Cette opération est répétée en additionnant successivement 50 et 30 ml du solvant au marc récupéré à chaque fois après filtration.

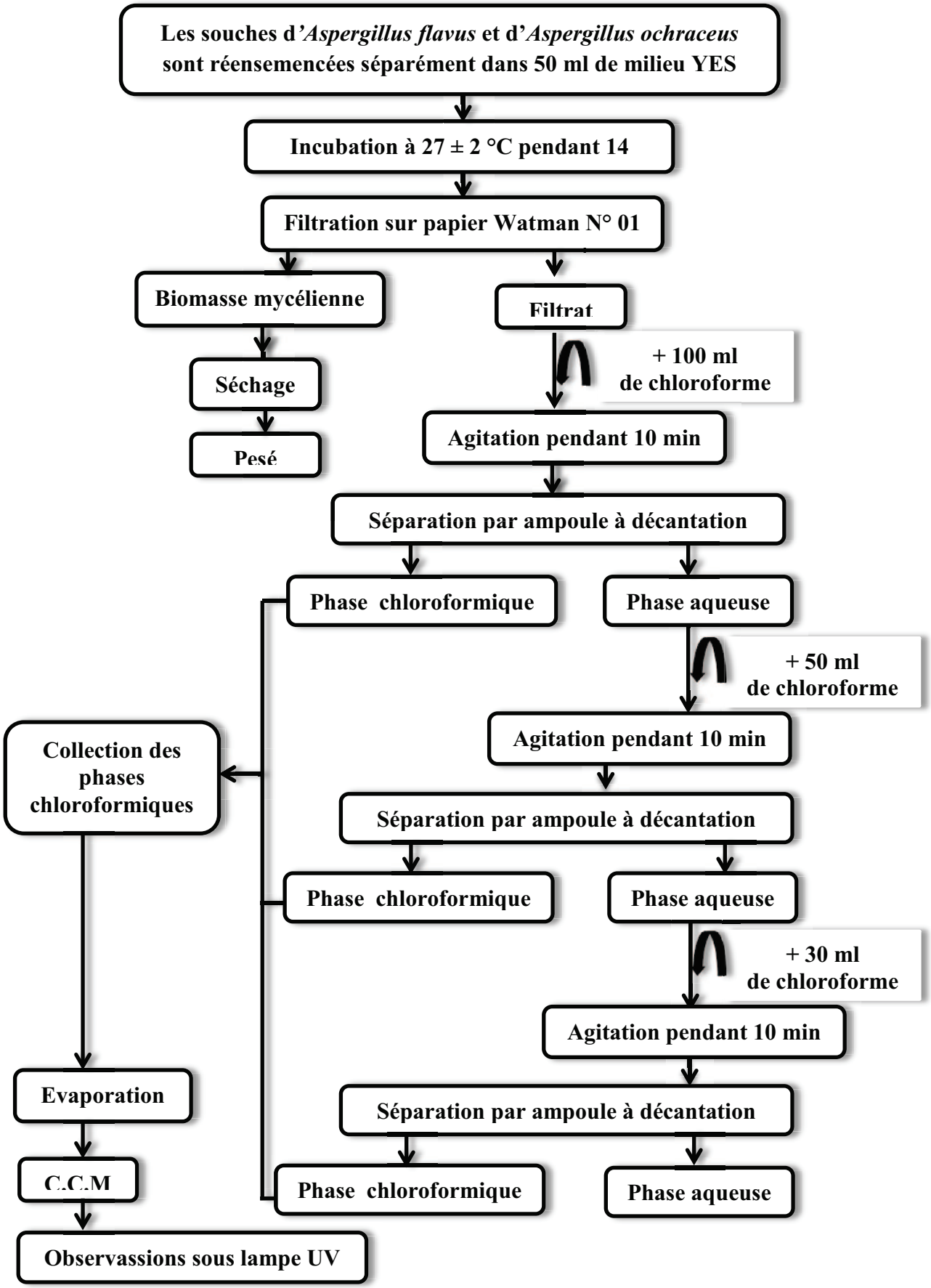


Figure 11. Procédé d'extraction des mycotoxines (MULTON, 1982).

Le filtrat est ensuite concentré jusqu'à un volume de 2 à 3 ml par évaporation au rotavapor. L'extrait obtenu est étalé sur un gel d'agar à 2 % et à pH 7 coulé préalablement sur boites de pétri puis solidifié. Les boites sont laissées entrouvertes afin de permettre l'évaporation du solvant d'extraction, puis elles sont gardées à 4°C pendant 24 heures.

Après la diffusion des mycotoxines à l'intérieur de la gélose, la surface est essuyée à plusieurs reprises avec du papier filtre imbibé d'hexane pour éliminer les macromolécules de la matière organique. Le gel d'Agar est ensuite découpé en petits carreaux et mélangé avec 100 ml de chloroforme. Le tout est agité pendant 10 minutes puis filtré.

Le marc est ensuite additionné à 50 et 30 ml de chloroforme et agité à chaque fois qu'il est récupéré après filtration. Les filtrats obtenus sont également mélangés puis concentrés à l'aide d'un rotavapor jusqu'à un volume de 2 à 3 ml. Une séparation par CCM est enfin effectuée de la même façon que pour les souches productrices de mycotoxines **(ZUBER et *al*., 1987)**. La figure 12 résume les différentes étapes d'extraction des mycotoxines à partir du substrat solide.

I. 5. Préparation des extraits et étude phytochimique

Dans ce volet de notre travail, nous avons essayé de recueillir un ensemble d'informations sur notre deuxième matériel végétal qui est les graines de *Citrullus colocynthis*. Les graines ont été nettoyées et lavées avec de l'eau du robinet puis séchées à l'ombre. Elles ont ensuite été pesées et broyées grossièrement (Figure 13).

I. 5.1. Détermination de la teneur en eau des graines de *Citrullus colocynthis*

Le taux d'humidité dans nos échantillons (graines sèches), a été déterminé par le procédé de dessiccation à une température de 105 ± 2°C dans une étuve isotherme ventilée type (Memmert) jusqu'à l'obtention d'un poids constant **(LINDEN et LORIENT, 1994).**

$$H\% = ((P_0 - P_t) - (P_1 - P_t))/ (P_0 - P_t) \times 100.$$

I. 5.2. Préparation des extraits méthanolique et aqueux

a- Extraction au méthanol

Les extractions ont été effectuées seulement sur les graines de *Citrullus colocynthis*. La technique appliquée pour l'extraction au méthanol est celle utilisée par **SENHAJI** et ***al* (2005)**.

Une quantité de 20 g est prise dans un erlenmeyer, à laquelle nous avons ajouté 100 ml de solvant (méthanol). Après 3 heures de macération sous agitation continue à 200 tours/min, le mélange est filtré sur papier filtre Wattman N° 01.

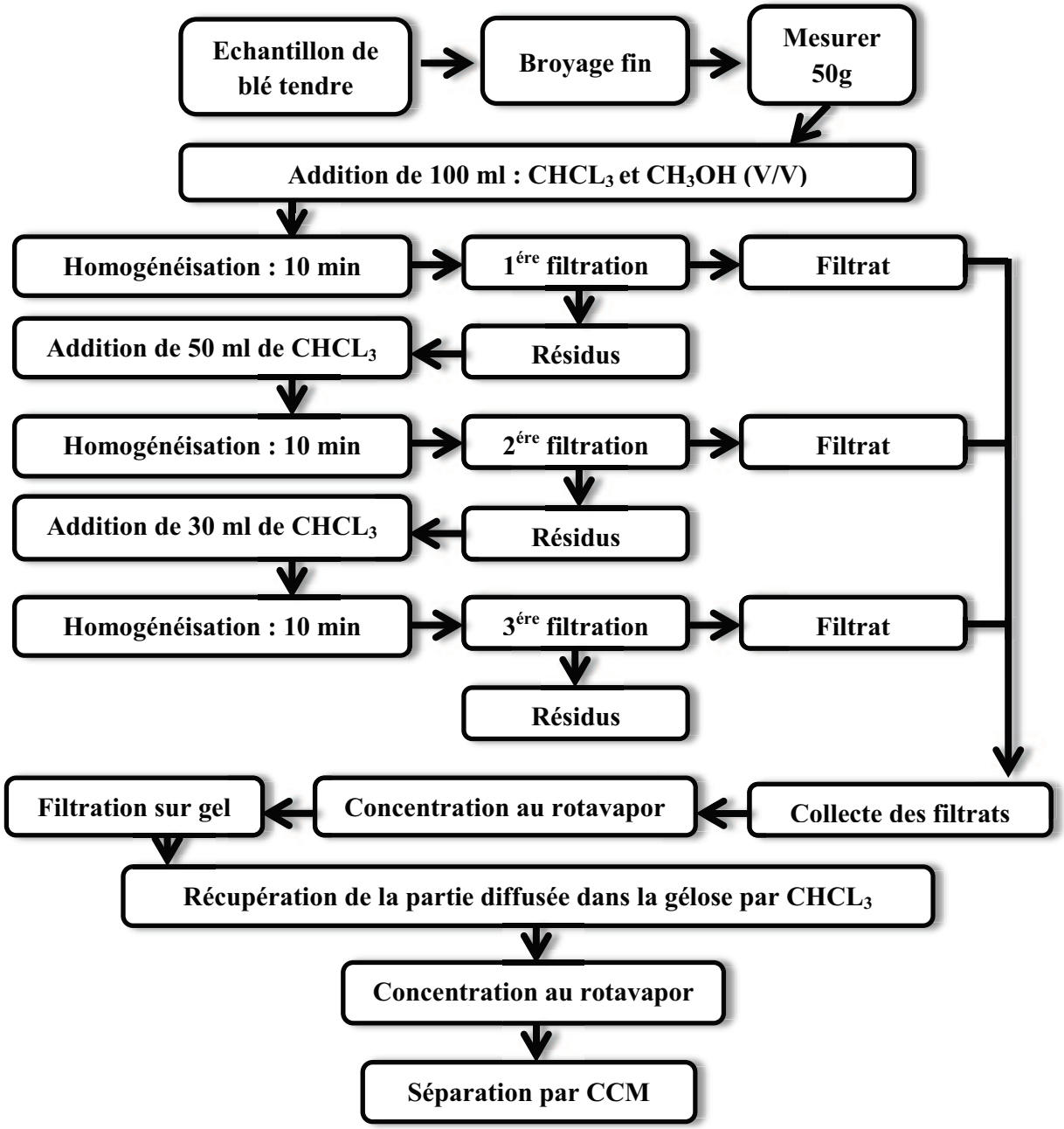


Figure 12. Procédé d'extraction des mycotoxines à partir du substrat solide (ZUBER et *al.*, 1987).

Figure 13. Préparation de la poudre des graines de *Citrullus colocynthis* (photo originale).

Cette opération est répétée quatre fois avec renouvellement du solvant afin d'épuiser le marc et augmenter le rendement. La figure 14 résume les étapes de l'extraction méthanolique.

b- Extraction par macération à l'eau

Un extrait aqueux est également préparé par macération dans de l'eau distillé froide à raison de 10 % pendant 24 heures. Le mélange est ensuite centrifugé à 3600 g pendant 30min. Le surnagent est récupéré puis filtré sur papier filtre Wattman N° 01. Cette opération est répétée quatre fois. A la fin de l'extraction, les fractions obtenus sont récupérées dans un flacon et conservées à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'au moment de leurs utilisations **(SHENG-HSIEN et *al.*, 2007)**. La figure 15 résume les étapes de l'extraction aqueuse.

I. 5.3. Détermination du rendement des extraits secs

Afin de pouvoir calculer le rendement de chaque extrait (méthanolique et aqueux), l'extrait aqueux est récupéré sec par évaporation de l'eau dans une étuve à 50°C. Pour l'extrait méthanolique, le rotavapor est utilisé à une température de 50°C pour évaporer le méthanol.

Le rendement est déterminé par le rapport du poids de l'extrait sec après évaporation sur le poids de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction, multiplié par 100% **(BEKHECHI-BENHABIB, 2001)**.

$$\mathbf{Rd\ \% = (m_1\ X\ 100)\ /\ m_0}$$

- **m_1 :** masse en gramme de l'extrait sec ;
- **m_0 :** masse en gramme de la matière végétale sèche ;
- **Rd :** rendement.

I. 5.4. Tests phytochimiques

Les composés chimiques sont déterminés par une étude phytochimique qui consiste à caractériser les différentes catégories de molécules existantes dans les graines de la plante. Ces dernières vont servir à obtenir des principes actifs utilisés comme agents thérapeutiques **(BRUNETON, 1999).**

Pour ce faire, les différents extraits obtenus ont été soumis aux tests phytochimiques. Ces derniers sont basés sur des essais de solubilité, des réactions de colorations et de précipitations, ainsi que des examens en lumière ultraviolette. Les différentes familles de composés chimiques recherchées dans cette étude sont les suivantes :

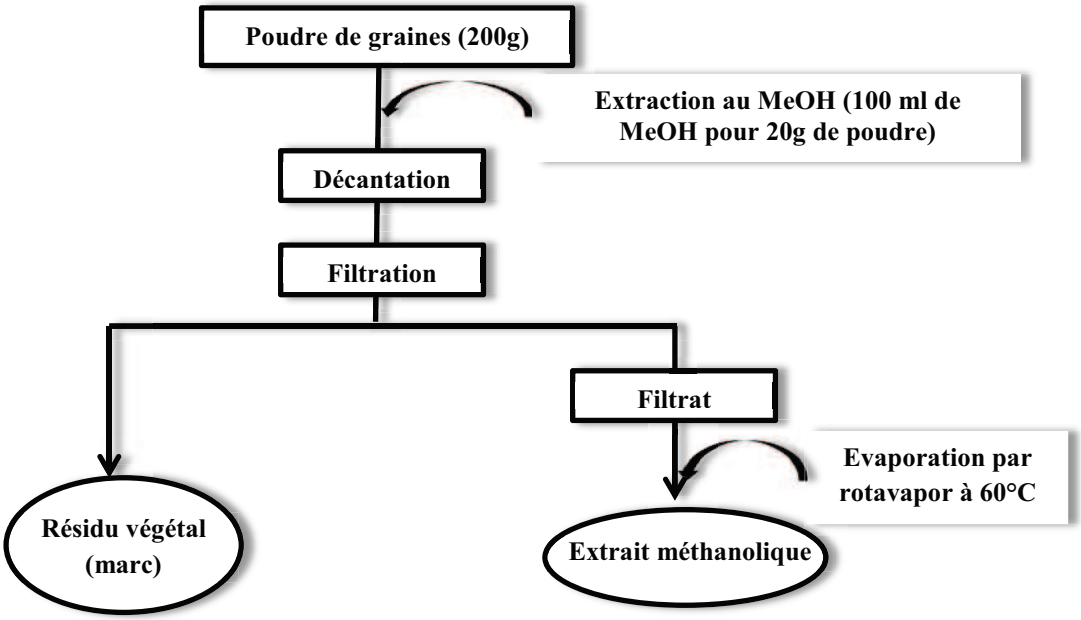


Figure 14. Extraction méthanolique à partir des graines de *Citrullus colocynthis* (SENHAJI et *al.*, 2005).

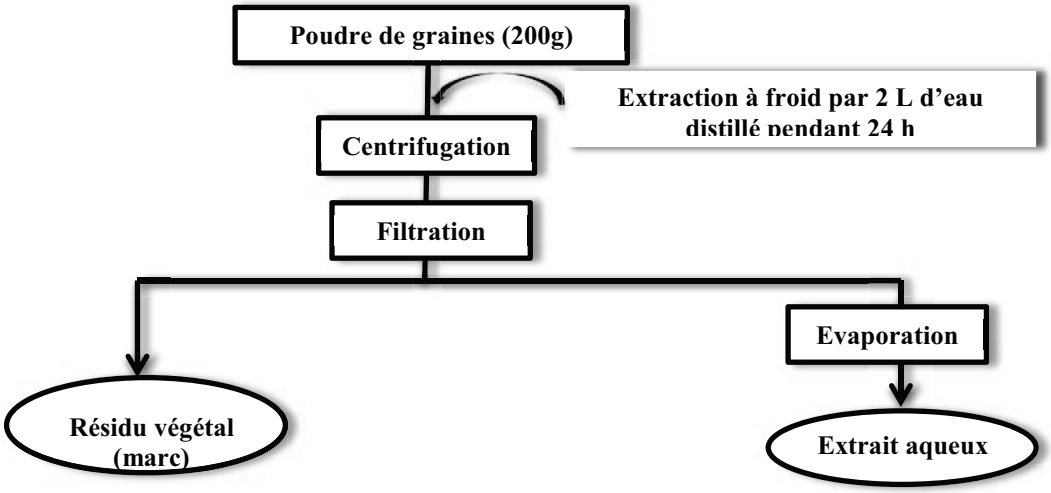


Figure 15. Extraction aqueuse à partir des graines de *Citrullus colocynthis* (SHENG-HSIEN et *al.*, 2007).

a- Détection des polyphénols

a1- 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 $FeCl_3$ (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 (Figure 16) **(KARUMI et *al*., 2004).**

a2- Détection des coumarines

Les coumarines sont révélés à partir de 5 ml d'extrait placé dans un tube porté à ébullition jusqu'à l'obtention d'un volume de 1 ml, ce volume est ajouté à 1ml d'eau chaude. Après agitation, le volume total est devisé en deux volume, l'un sert de témoin et l'autre est ajouté à 0.5 ml de NH_4OH (10%) puis examiné sous lampe UV. L'émission de la fluorescence indique la présence des coumarines (Figure 16) **(BRUNETON, 1999)**

a3- Détection des anthocyanes

Les anthocyanes sont détectés en plaçant 5 ml d'extrait dans un tube auquel en ajoute 15 ml d'H_2SO_4 à (10%) (milieu acide), après agitation, le mélange est ajouté à 5 ml NH_4OH à (10%) (milieu basique). La présence d'anthocyanes est affirmée par une coloration bleu-violacée en milieu basique (Figure 16) **(BRUNETON, 1999)**.

a4- Détection des flavonoïdes

Un mélange de quelques gouttes de mg^{2+} et de gouttes d'HCL concentré, placé dans un tube, est ajouté à 2ml d'extrait. L'apparition de la coloration rose, orange ou rouge indique la présence des flavonoïdes (Figure 16) **(MALEC et PAMELIO, 2003)**.

a5- Détection des anthraquinones

Pour la détection des anthraquinones, 10 ml d'extrait sont ajoutés à 5 ml de NH_4OH à (10%). Après agitation, l'apparition d'un anneau rouge indique la présence d'anthraquinone (Figure 16) **(OLOYEDE, 2005)**.

a6- Détection des saponosides

Pour la détection des saponosides, 10 ml d'extrait placé dans un tube à essais sont agités pendant 15 secondes puis déposés durant 15 minutes. Une hauteur de mousse persistante, supérieure à 1 cm indique la présence de saponosides **(KOFFI et *al.*, 2009).**

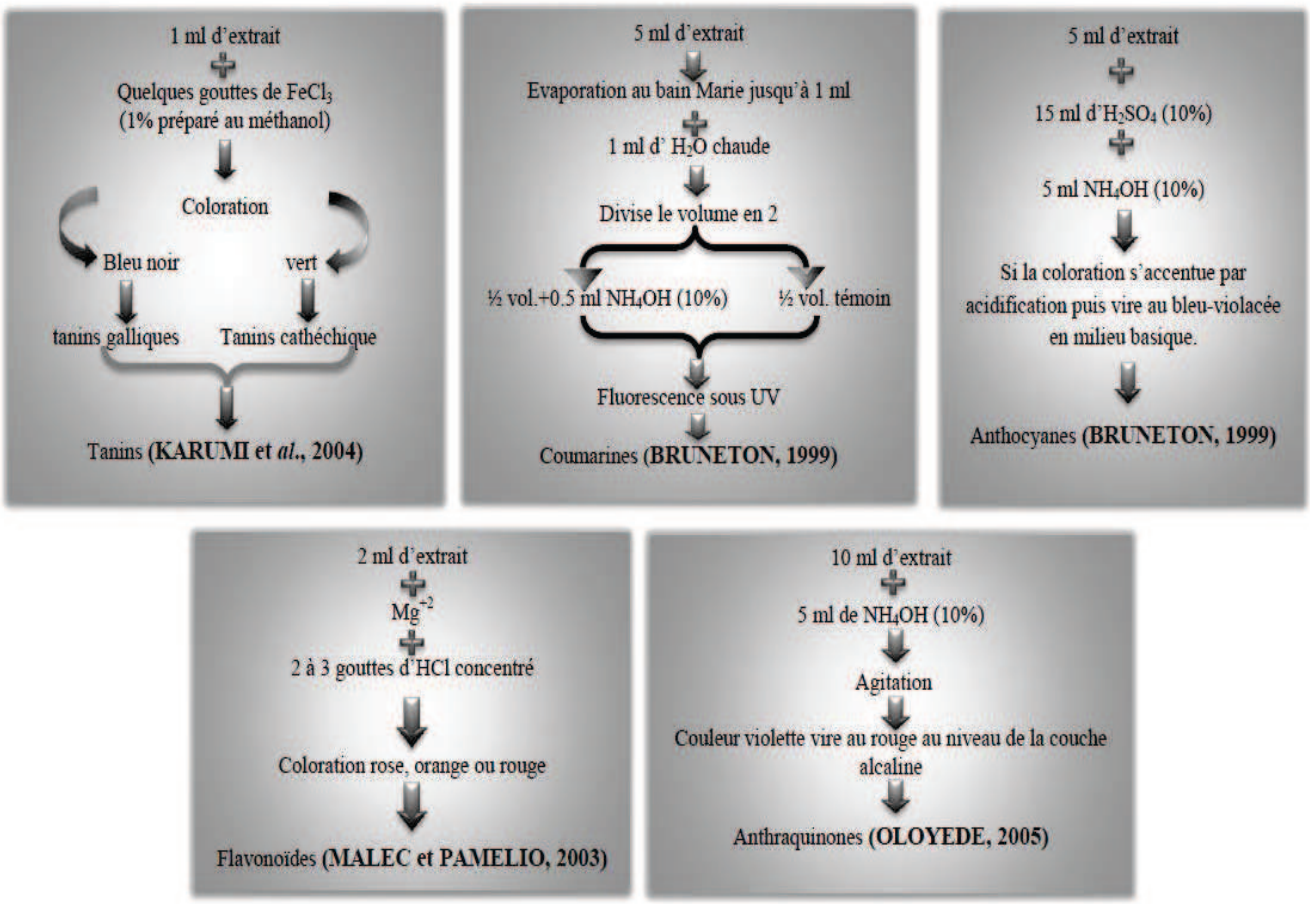


Figure 16. Schéma des tests phytochimiques pour la détection des polyphénols.

b- Détection des terpènes

b1- 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 (Figure 17) **(BRUNETON, 1999).**

c- 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 0,2ml, 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 ajouté. L'apparition d'un précipité blanc jaunâtre ou brun indique la présence d'alcaloïdes (Figure 18) **(MOJAB et *al*., 2003)**.

Toutes les expériences sont réalisées en triplicata pour vérifier la reproductibilité des résultats. Les figures (16, 17 et 18) résume les différentes étapes de détermination de ces composés phytochimiques.

I. 6. Essai d'activité biologique des extraits méthanolique et aqueux

I. 6.1. Souches fongiques testées

Parmi les souches fongiques isolées purifiées et identifiées préalablement à partir du blé tendre, quatre souches ont été sélectionnées pour servir à déceler l'activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* à savoir :

- *Aspergillus flavus,*
- *Aspergillus ochraceus*
- *Aspergillus niger.*
- *Aspergillus fumigatus.*

Les souches sont conservées à 4°C dans des tubes contenant 10 ml de milieu PDA incliné.

I. 6.2. Préparation des pré-cultures

Le PDA est le milieu de culture utilisé pour l'entretien des souches fongiques et la réalisation des tests antifongiques, alors que la réalisation des tests antimycotoxinogénes est effectuée sur milieu liquide YES.

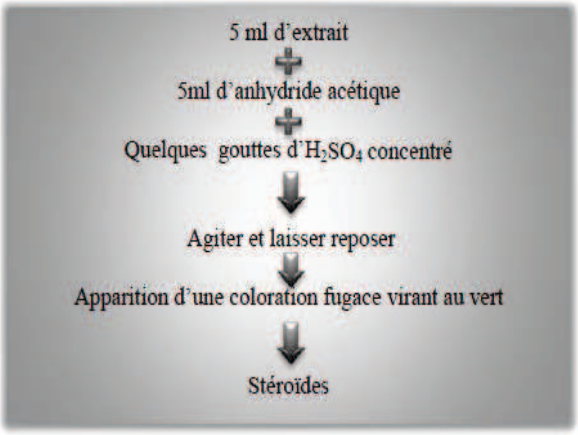


Figure 17. Schéma du test phytochimique pour la détection des stéroïdes (BRUNETON, 1999).

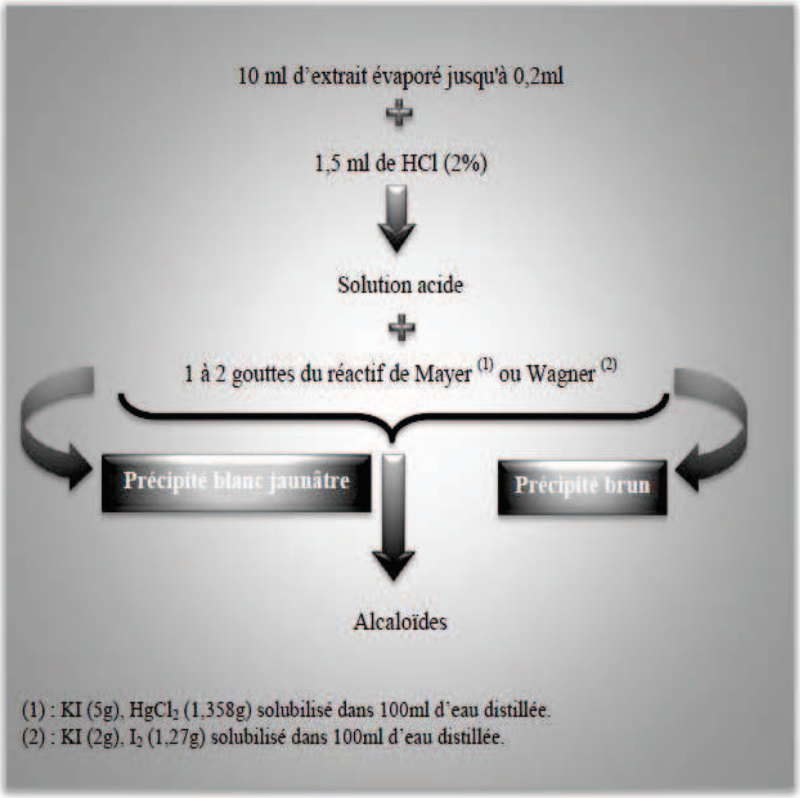


Figure 18. Schéma du test phytochimique pour la détection des alcaloïdes (MOJAB et *al.*, 2003).

Afin de préparer des cultures jeunes, les souches fongiques utilisées ont été cultivées dans des boites de Pétri contenant 20 ml de milieu PDA suivi d'une incubation de trois à sept jours à 25 ± 2°C.

I. 6.3. Essai d'activité antifongique par la méthode de micro-dilution en milieu solide

Avant d'évaluer l'activité antifongique des extraits, la toxicité du solvant peut également être critique. A cet effet, nous avons testé (test control) l'innocuité du DMSO (diméthyl sulfoxyde) utilisé a la place du méthanol pour solubiliser les fractions séches de *Citrullus colocynthis*. Cette substitution de solvant a été basée sur les travaux précédents indiquant l'effet positif du méthanol sur la croissance de certaines souches fongiques.

La méthode de micro-culture en milieu solide permet la détermination de la concentration minimale fongicide (CMF) à partir d'une gamme variable de concentrations de notre extraits (aqueux et méthanolique) dans le milieu de culture. La CMF est définit comme étant la plus petite concentration d'antifongique qui tue ≥ 99.9 % de l'inoculum **(LASS-FLORL et *al*., 2010).**

D'après la méthode de **BILLERBECK** et ***al* (2002)**, une solution-mère de chaque extrait est réalisée avec du DMSO pour l'extrait méthanolique et de l'eau distillée stérile pour l'extrait aqueux. Une série de dilutions à raison géométrique de 2 est ensuite réalisée pour pouvoir étudier l'effet antifongique de nos extraits sur les souches fongiques sélectionnées

La fourchette de concentrations finales ainsi obtenue correspond à 5- 2.5- 1- 0.5 - 0.25 - 0.125 - 0.0625 - 0.0312 - 0.0156 - 0.0078 - 0.0039 - 0.0019 et 0.0010 %. Après solidification du milieu PDA, l'inoculation se fait par le dépôt d'un disque mycélien d'environ 0,6 cm de diamètre d'une pré-culture de 3 à 7 jours au centre de la boite de Pétri (Figure 19).

Des témoins de croissance sont réalisés pour chaque souche et chaque série d'essais. Tous les essais sont réalisés à double reprise. Après incubation à 25 ± 2°C pendant cinq jours, la croissance est comparée à celle du témoin (sans extrait).

A partir des résultats obtenus, on peut donc déterminer l'indice antifongique (IAF) de chaque extrait par la formule décrite par **WANG et *al* (2005).**

Indice antifongique = (1 –(Da / Db)) x100%.

Avec :

- **Da :** le diamètre de la zone de croissance de l'essai
- **Db :** le diamètre de la zone de croissance du témoin.

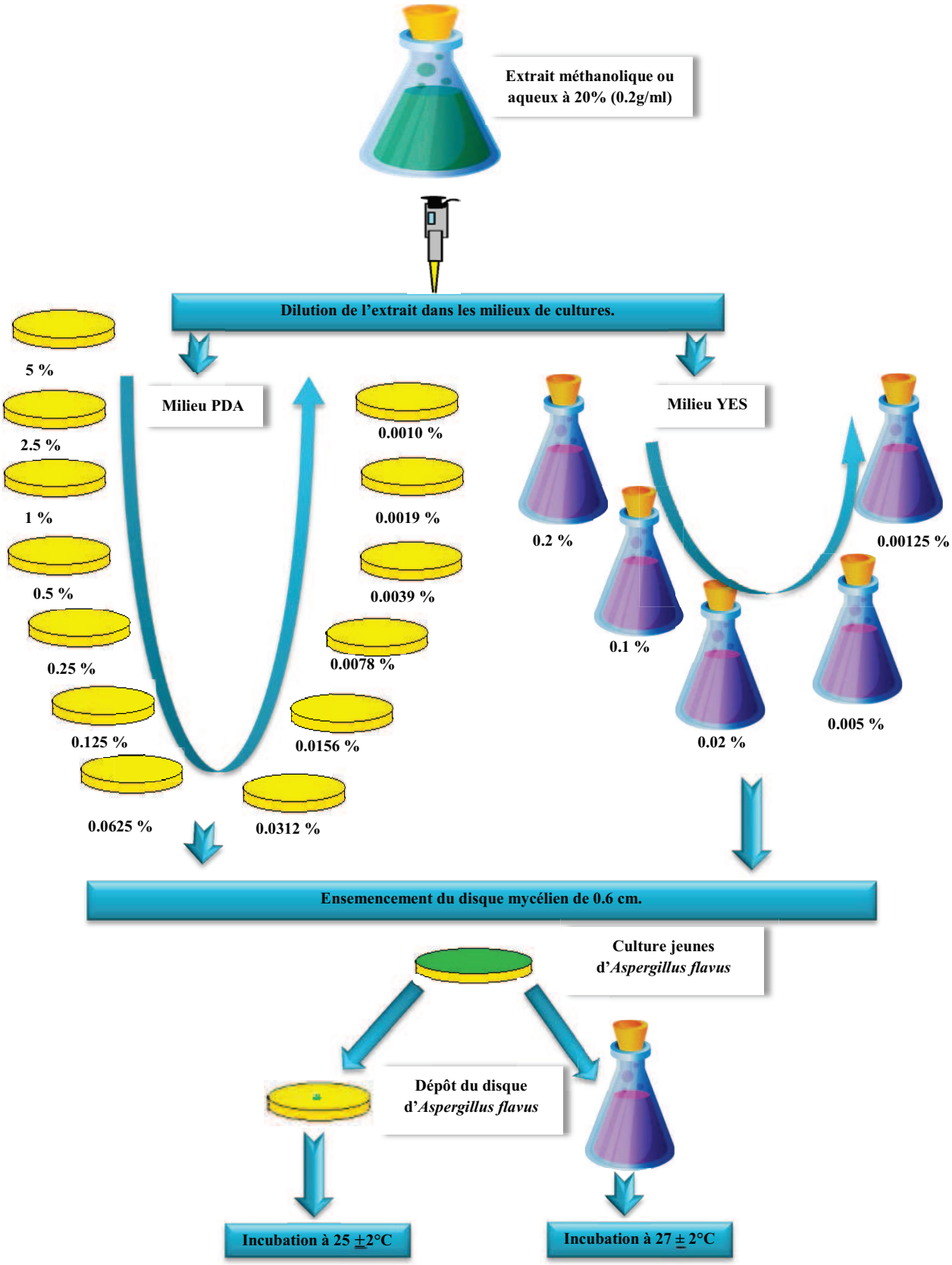


Figure 19. Détermination de la CMF des extraits des graines de *Citrullus colocynthis* (BILLERBECK et *al*., 2002 ; MULTON, 1982).

Pour les boites qui ne présentent pas de croissance, le disque mycélien est transféré sur un milieu PDA neuf pour confirmer s'il s'agit d'un effet fongistatique ou fongicide.

I. 6.4. Test d'activité antimycotoxinogéne

Suivant la méthode décrite par **MULTON** en **1982**, l'étude de l'effet antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux a été testé contre deux espèces *Aspergillus* sur le milieu YES afin de pouvoir extraire les mycotoxines produites. A titre individuel, chacun des deux extraits (des graines de *Citrullus colocynthis*) a été additionné à 50 ml de milieu YES mais à des concentrations finales variables de l'ordre de 0.2%, 0.1%, 0.02%, 0.005% et 0.00125%. Après une rigoureuse agitation, les différents milieux sont inoculés de disques de 0.6 cm de diamètre contenant des cultures jeunes de 3 à 7 jours d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus ochraceus*. Des tests témoins et de contrôle sont réalisés pour chaque souche et chaque série d'essais (Figure 19).

Après une durée d'incubation de 14 jours à 27 $\pm$ 2°C, les mêmes étapes citées précédemment pour l'extraction des mycotoxines ont été suivies.

Résultats et discussions.

II. Résultats et discussions.

II. 1. Qualité physicochimique et microbiologique du blé tendre local et importé

Durant cette première partie, l'étude est portée sur le contrôle (qualitatif et quantitatif) du blé tendre local et importé stocké. A cet effet, les analyses effectuées visent de près l'aspect physicochimique, microbiologique et mycotoxicologique du blé tendre utilisé.

II. 1.1. Qualité physicochimique du blé tendre local et importé

a- Pourcentage des grains cassés (état physique des grains)

Sur les 100 grains prélevés (au hasard), une constatation de l'état physique a été effectuée. Le résultat en relation est représenté par les valeurs moyennes des grains cassées en fonction des deux types de blé tendre. En matière de chiffre, le blé tendre local présente un taux de grains cassés légèrement supérieur (5.34%) au blé tendre importé (4.32%) (Figure 20).

b- Humidité (H)

D'après les résultats affichés sur la figure 21, les deux variétés de blé tendre révèlent des taux d'humidités plus ou moins importantes. Les valeurs moyennes des deux types de blé sont plus ou moins proches mais avec un léger avantage pour le blé importé. Elles sont respectivement de l'ordre de 10.23% et 11.57% pour celui du local et importé.

c- Le pH

Les valeurs moyennes du pH des différents échantillons du blé tendre illustrées sur la figure 22 démontrent que l'ensemble des échantillons présente un pH légèrement acide avec des valeurs moyennes de 6.71 pour le blé tendre importé et de 6.60 pour le blé tendre local.

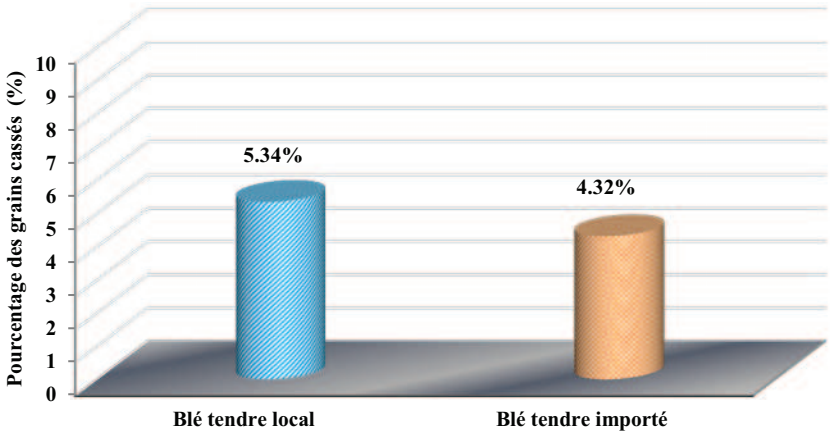


Figure 20. Moyennes des grains cassés des échantillons de blé tendre local et importé.

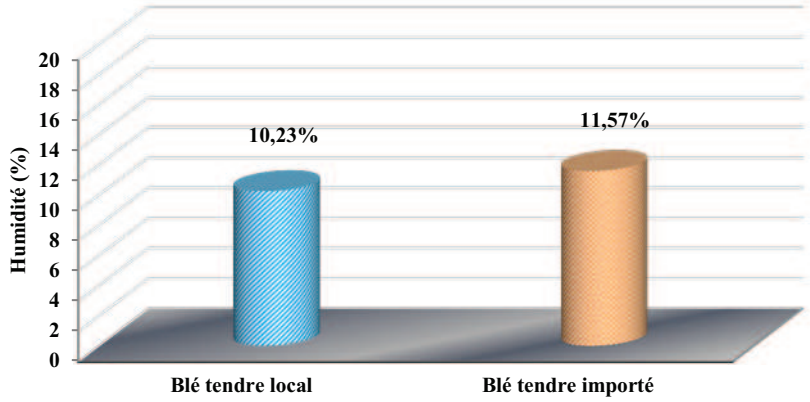


Figure 21. Humidité moyenne des échantillons de blé tendre local et importé.

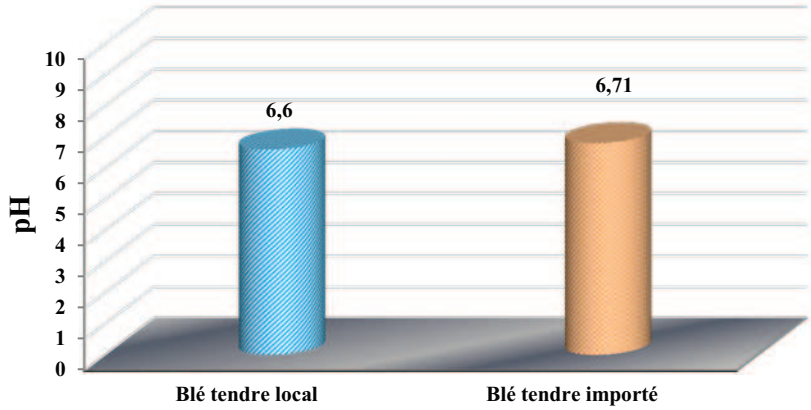


Figure 22. pH moyen des échantillons de blé tendre local et importé.

II. 1.2. Qualité microbiologique du blé tendre local et importé

Le dénombrement de la flore fongique a été estimé sur trois types de milieux de culture à savoir : PDA, CDA et DRBC, afin de contrôler la diversité fongique de nos échantillons (Photo 05). Il est effectué après l'identification de chaque espèce fongique apparut.

II. 1.3. Identification des moisissures

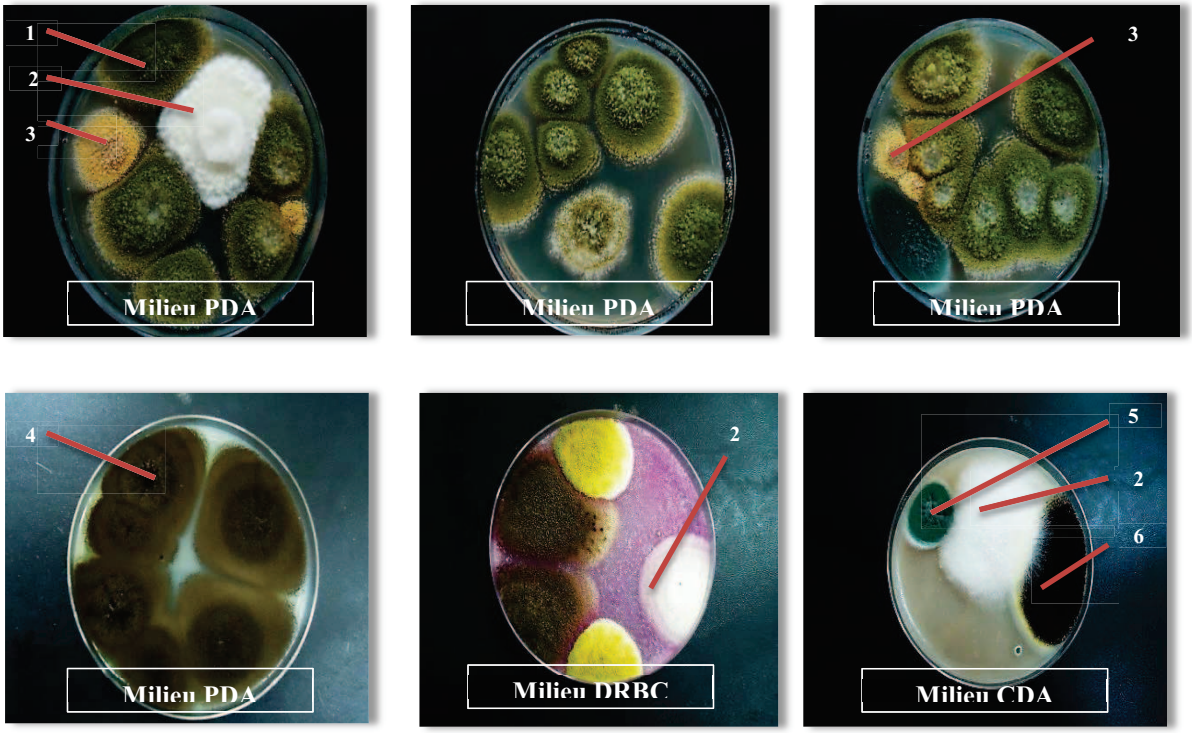
a- Genres fongiques identifiés par la méthode de micro-culture et de Scotch

Selon **BARNETT** et **HUNTER (1972)** et en se basant sur l'étude des caractères macroscopiques (couleur, aspect de colonie et le revers des boites …) et microscopiques (forme de thalle et des spores…) des souches fongiques isolées, nous avons identifié plusieurs genres (Photo 06).

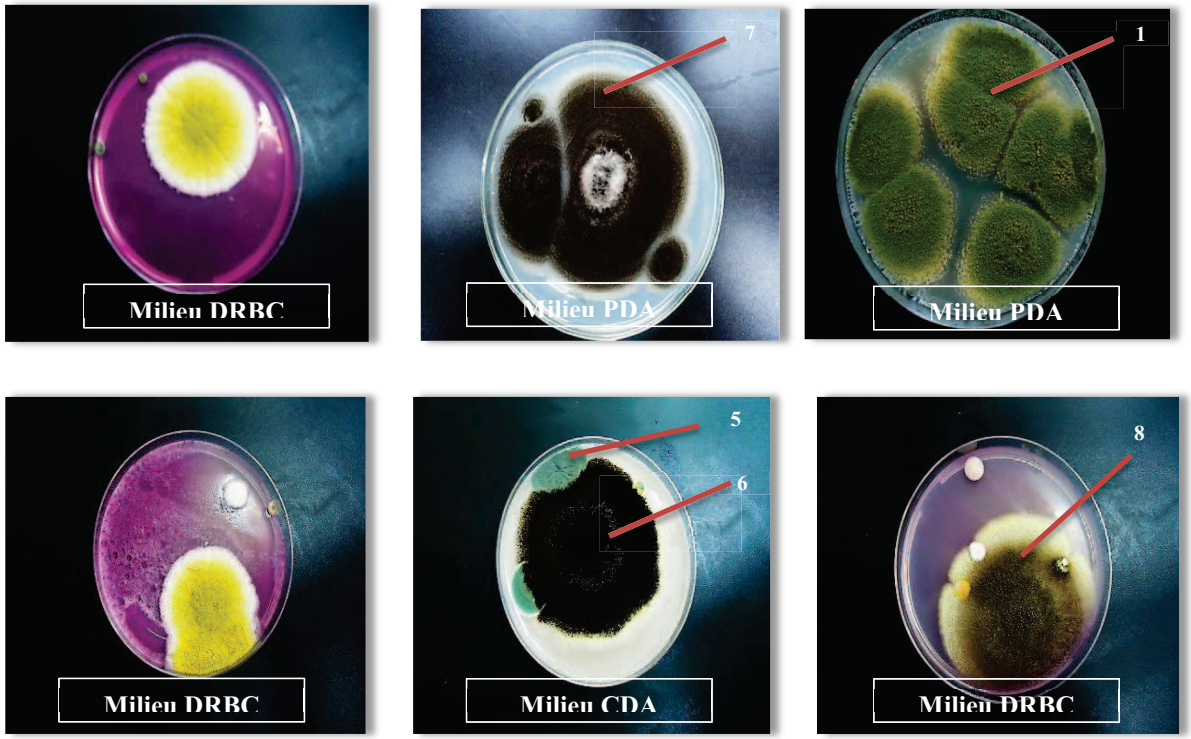
Sur la base de l'observation microscopique de la souche fongique A mettant en évidence les têtes conidiennes, unisériées ou bisériées, d'abord radiées, puis reparties en plusieurs colonnes de spores mal individualisées, jaunâtres au début, puis vert-jaune foncé. Les conidiophores sont verruqueux. Les vésicules sont sub-globuleuses. Les phialides sont insérées directement sur la vésicule ou portées par des métules. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses, de couleur verte pâle, verruqueuses. Les sclérotes, fréquents dans les isolats récents, sont globuleux à sub-globuleux, d'abord blanc puis virant au brun-rouge foncé et au noir. Nous pouvons déduire qu'il s'agit d'*Aspergillus flavus* (Photo 06).

L'observation microscopique de la souche fongique B mettant en évidence les têtes conidiennes, bisériées, radiées, sont disposées en plusieurs colonnes brunâtres ou noires. Les conidiophores sont lisses, hyalins ou brunâtres dans leur moitié supérieure. Les vésicules sont globuleuses. Les phialides sont portées par des métules brunâtres, de dimensions variables. Les conidies sont habituellement globuleuses, parfois légèrement aplaties. Elles sont brunes, échinulées à très verruqueuses. Les sclérotes parfois différenciés, sont crème à chamois foncé au début, puis virent au chamois vinacé. Nous pouvons déduire qu'il s'agit d'*Aspergillus niger* (Photo 06).

Sur la base de l'observation microscopique de la souche fongique C mettant en évidence Les têtes conidiennes, strictement unisériées, en colonne compacte sont d'abord bleu-vert puis virant au vert bronze. Les conidiophores sont courts, lisses, s'élargissent insensiblement au sommet en formant des vésicules subhémisphériques vertes. Les phialides dressées, sont densément groupées, de couleur verte. Les conidies sont globuleuses à sub-globuleuses et sont échinulées. Nous pouvons déduire qu'il s'agit d'*Aspergillus fumigatus* (Photo 06).



Souches fongiques isolées du blé tendre importé à la dilution 10^{-2}



Souches fongiques isolées du blé tendre local à la dilution 10^{-2}

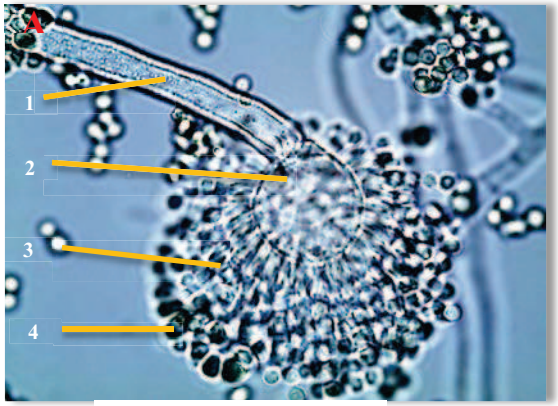
Photo 05. Dénombrement des souches fongiques sur les milieux d'isolements (photo original). **(1) :***Aspergillus flavus*, **(2) :** *Penicillium sp*, **(3) :** *Aspergillus ochraceus*, **(4) :** *Alternaria*, **(5) :** *Aspergillus fumigatus*, **(6) :** *Aspergillus niger*, **(7) :** *Cladosporium*, **(8) :** *Ulocladium.*

L'observation microscopique de la souche fongique D permet de distinguer les têtes conidiennes bisériées, d'abord globuleuses puis se séparent en 2 ou 3 colonnes divergentes, bien individualisées, de couleur jaune, ocre-jaune ou chamois. Les conidiophores sont rugueux, jaunes à brun pâle et longs. Les vésicules sont globuleuses, hyalines. Les phialides sont portées par des métules, de dimensions variables. Les conidies sont sub-globuleuses à globuleuses. Elles sont finement échinulées ou lisses. Les sclérotes, souvent présents, de couleur lavande à pourpre, sont globuleux, ovales ou cylindriques. Nous pouvons déduire qu'il s'agit d'*Aspergillus ochraceus* (Photo 06).

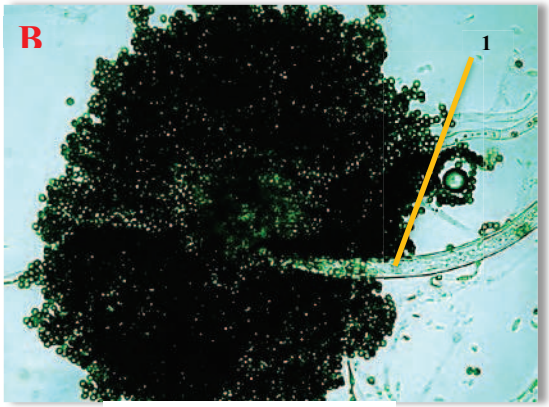
L'observation microscopique de la souche fongique E permet de distinguer des organisations en pinceau. Le thalle, formé de filaments mycéliens septés et hyalins, porte des conidiophores lisses ou granuleux, simples ou ramifiés qui se terminent par un pénicille. Les conidiophores peuvent être isolés, groupés en faisceaux lâches ou agrégés en corémies bien individualisés. Nous pouvons déduire qu'il s'agit du genre *Penicillium* (Photo 06).

b- Espèces fongiques identifiées par la méthode de « Single spore »

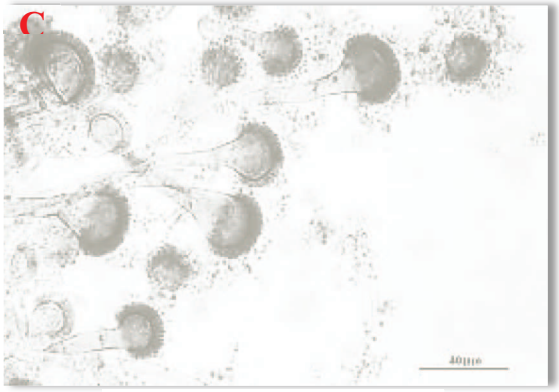
Par le biais de cette méthode et en se référant aux clefs d'identification de **PITT (1973)** pour les Aspergillus et **RAMIREZ (1982)** pour les Pénicillium, on a pu identifier les espèces démontré dans les photos 07 et 08. Les principaux caractères des différentes souches identifiées sont également résumés dans les tableaux 08 et 09.



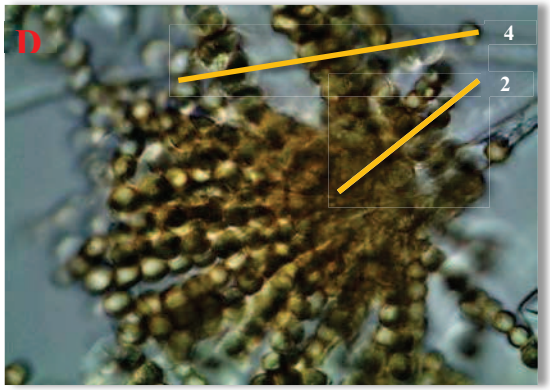
Aspergillus flavus



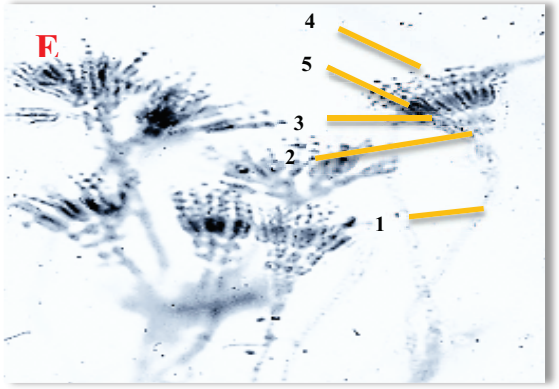
Aspergillus niger

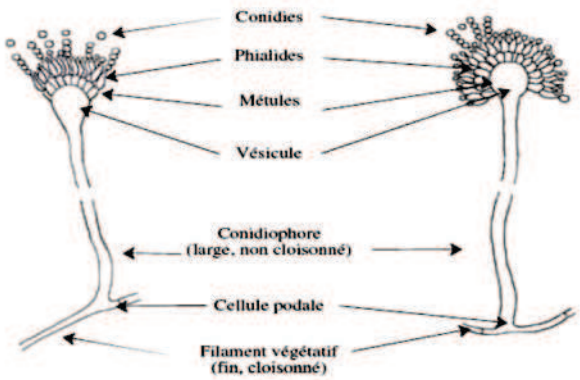


Aspergillus fumigatus



Aspergillus ochraceus





Penicillium. spp

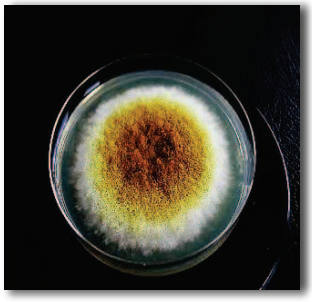
Photo 06. Aspect microscopique des souches d'*Aspergillus* et de *Penicillium* (photo original). **(1) :** Conodiophore, **(2) :** Vésicule, **(3) :** Métule, **(4) :** conidies, **(5) :** Phialide.

Tableau 08. Identification des espèces de *Penicillium* par la méthode de Single Spore.

		LECTURE	
GENRES ESPECES	**MILIEU**	**COULEUR**	**Diamètre en mm**
Penicillium expansum	MEA 25°C	**VERT FONCE**	**40**
	CYA 25°C	**BLANC AVEC FISSURES**	**37**
	CDA 25°C	**VERT BLANCHATRE**	**29**
	G25N 25°C	**BEIGE**	**45**
Penicillium indicum	MEA 25°C	**VERT FONCE**	**38**
	CYA 25°C	**BLANC JAUNATRE**	**33**
	CDA 25°C	**VERT BLANCHATRE**	**24**
	G25N 25°C	**MARRON VERDATRE**	**35**
Penicillium funiculosum	MEA 25°C	**VERT FONCE**	**44.5**
	CYA 25°C	**ROUGE VERDATRE**	**44**
	CDA 25°C	**VERT PALE**	**54**
	G25N 25°C		**Absence**
Penicillium restrictum	MEA 25°C	**VERT FONCE**	**47.5**
	CYA 25°C	**ROSE + CONTOURS BLANC VERDATRE**	**32**
	CDA 25°C		Absence
	G25N 25°C	**BEIGE**	**30**
Penicillium hispanicum	MEA 25°C	**VERT FONCE**	**33**
	CYA 25°C	**BLANC + FISSURES**	**32**
	CDA 25°C	**BLANC BLANCHATRE**	**44**
	G25N 25°C	**BEIGE COTTON**	**38**
Penicillium griseo-purpurum	MEA 25°C	**VERT +CONTOUR BLANC+ SCLEROTES**	**38**
	CYA 25°C	**BLANC VERDATRE**	**37**
	CDA 25°C	**VERT FONCE**	**37**
	G25N 25°C	**BLANC**	**30**
Penicillium *pelacinicum*	MEA 25°C	**VERT GRISATRE+CONTOUR BLANC+SCLEROTE**	**30**
	CYA 25°C	**BLANC VERDATRE**	**39**
	CDA 25°C	**VERT GRISATRE+CONTOUR BLANC**	**34**
	G25N 25°C		**Absence**
Penicillium obscurum	MEA 25°C	**VERT GRISATRE+ SCLEROTE**	**37**
	CYA 25°C	**VERT GRISATRE**	**30**
	CDA 25°C	**BLANC / BEIGE**	33
	G25N 25°C		**Absence**
Penicillium lilacinium	MEA 25°C	**VERT +CONTOUR BLANC+ SCLEROTES**	**33**
	CYA 25°C	**BLANC VERDATRE**	**32**
	CDA 25°C	**BLANC +SCLEROTES ROUGES**	**30**
	G25N 25°C	**BLANC**	**38**

Penicillium pelacinicum. MEA

Penicillium expansum. MEA



Pénicillium sp. CDA

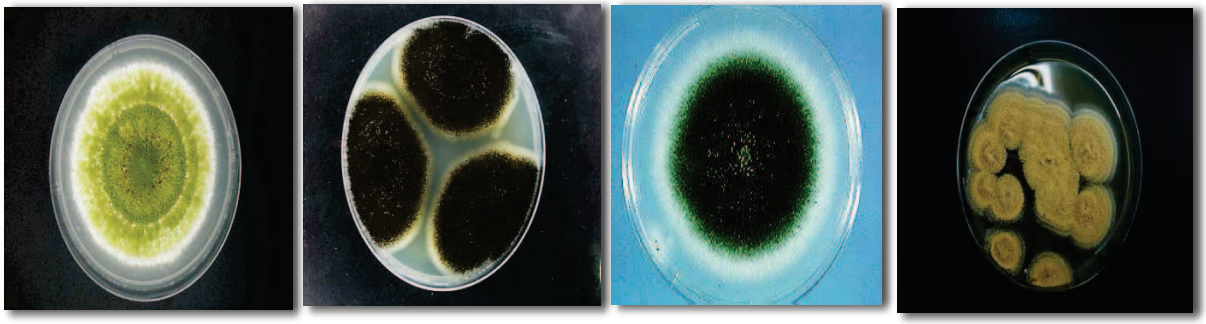
Penicillium lilacinium. CDA

Penicillium restrictum. G25N

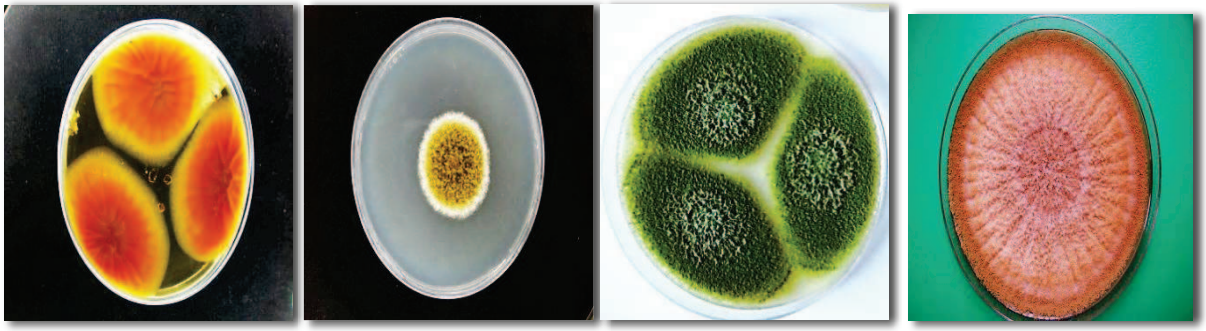
Photo 07. Identification des espèces *Penicillium* par la méthode de Single Spore (photo originale).

Tableau 09. Identification des espèces *Aspergillus* par la méthode de Single Spore.

		LECTURE	
GENRES ESPECES	**MILIEU**	**COULEUR**	**Diamètre en mm**
Aspergillus flavus	MEA 25°C	**VERT PISTACHE**	**58**
	CYA 37°C	**MARRON FONCE**	**52**
	CYA 5°C		Absence
	G25N 25°C	**JAUNE VERDATRE**	**50**
	AFAP	**BLANC+ REVERS ORANGE**	**48**
Aspergillus clavatus	MEA 25°C	**BLANC GRISATRE**	**48**
	CYA 37°C	**ROSE PALE**	**58**
	CYA 5°C		Absence
	G25N 25°C	**JAUNE VERDATRE**	**60**
Aspergillus fumigatus	MEA 25°C	**BLANC**	**45**
	CYA 37°C	**JAUNE PALE a JAUNE**	**50**
	CYA 5°C		Absence
	G25N 25°C	**JAUNE BLANCHATRE**	**51**
Aspergillus parasiticus	MEA 25°C	**VERT PISTACHE**	**77**
	CYA 37°C	**VERT /JAUNE**	**55**
	CYA 5°C		Absence
	G25N 25°C	**JAUNE PALE**	**57**
	AFAP	**BLANC+ REVERS ORANGE**	**50**
Aspergillus niger	MEA 25°C	**NOIR**	**45**
	CYA 37°C	**GRIS A NOIRS**	**56**
	CYA 5°C		**30**
	G25N 25°C		Micro colonie
Aspergillus terreus	MEA 25°C	**MARRON**	**45**
	CYA 37°C	**MARRON PALE**	**56**
	CYA 5°C	Absence	Absence
	G25N 25°C	**BLANC JAUNATRE**	**40**
Aspergillus fischeri	MEA 25°C	**NOIR**	**73**
	CYA 37°C	**GRIS**	**50**
	CYA 5°C		Absence
	G25N 25°C	**MARRON GRIS**	**56**
Aspergillus ochraceus	MEA 25°C	**JAUNE DORE**	70
	CYA 37°C	**JAUNE**	53
	CYA 5°C	**BEIGE**	20
	G25N 25°C	**JAUNE PALE**	55

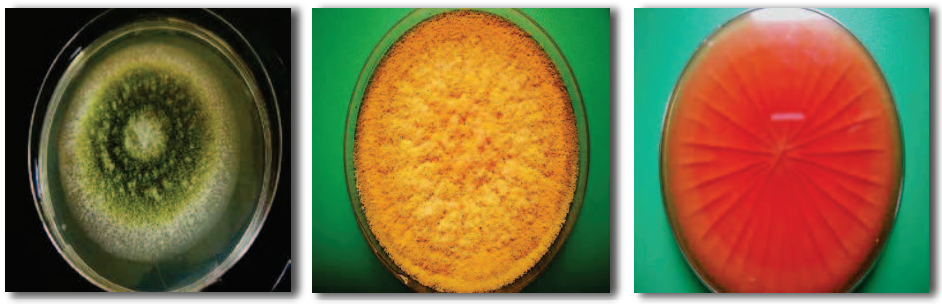


Aspergillus flavus. MEA *Aspergillus niger. CDA* *Aspergillus fumigatus. PDA* *Aspergillus ochraceus. PDA*



Aspergillus flavus. AFAP *Aspergillus ochraceus. MEA* *Aspergillus parasiticus. MEA* *Aspergillus clavatus. CYA*

Aspergillus flavus. PDA *Fusarium sp. PDA* *pergillus fischeri. CYA* *Aspergillus terreus.* CYA



Aspergillus parasiticus. PDA *Aspergillus fumigatus. CYA* *Aspergillus parasiticus. AFAP*

Photo 08. Identification des espèces *Aspergillus* par la méthode de Single Spore (photo originale).

II. 1.4. Dénombrement de la flore fongique

L'utilisation du milieu PDA a permis de révéler les mêmes souches fongiques chez les deux variétés de blé tendre à des taux différents (Figure 23 et 24).

Les genres les plus prédominants sont les *Aspergillus* et les *Penicillium*. Le taux de contamination par les *Aspergillus* chez la variété locale est plus important, il est de 24.13×10^2 UF/g (Figure 23). Par contre, le taux de contamination par le même genre chez la variété importé est de 18.98×10^2 UF/g (Figure 24). Le taux de contamination par le *Penicillium* est plus élevé chez la variété importée que chez la variété locale. Il est respectivement de 13.5×10^2 UF/g et 8.33×10^2 UF/g (Figure 23 et 24).

Les Aspergillus de la variété locale sont représentés essentiellement par *Aspergillus fumigatus* avec un taux de contamination de 11.83×10^2 UF/g et *Aspergillus flavus* avec un taux de contamination de 4.33×10^2 UF/g (Figure 23). La variété de blé tendre importée est surtout contaminée par *Aspergillus fischeri* avec un taux de contamination de 6.5×10^2 UF/g et *Aspergillus fumigatus* avec un taux de contamination de 5.83×10^2 UF/g. L'espèce *Aspergillus parasiticus* est totalement absente sur cet échantillon (Figure 24).

Les genres *Cladosporiums, Alternarias, Ulocladiums* et *Fusariums* révéler sur les deux variétés de blé tendre appartiennent à la flore du champ et la flore intermédiaire. Pour le *Rhizopus,* les figures 23 et 24 témoignent nettement qu'il est difficile de dénombrer ce genre à cause de son aspect cultural.

Il ressort aussi des figures 23 et 24 que la mycoflore totale du blé tendre importé est plus élevée que celle de la variété locale. Elle est respectivement de 45.46×10^2 UF/g et 36.95×10^2 UF/g.

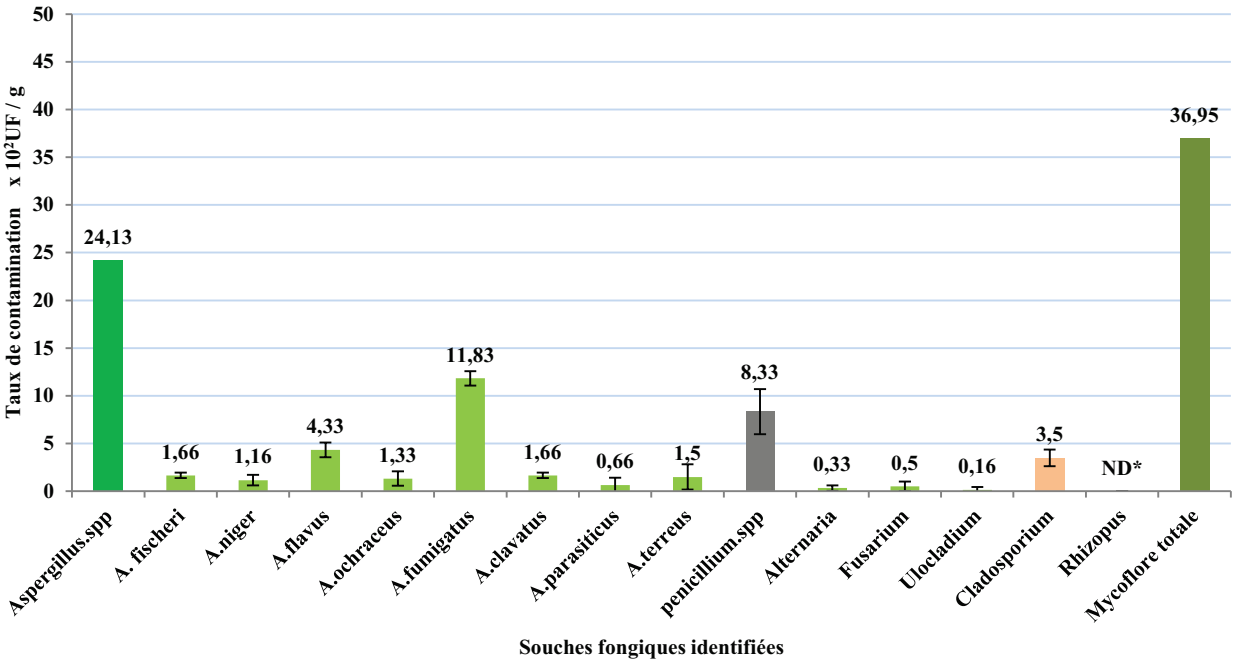


Figure 23. Moyenne de la mycoflore de blé tendre local détectée sur milieu PDA.

ND* : indénombrable

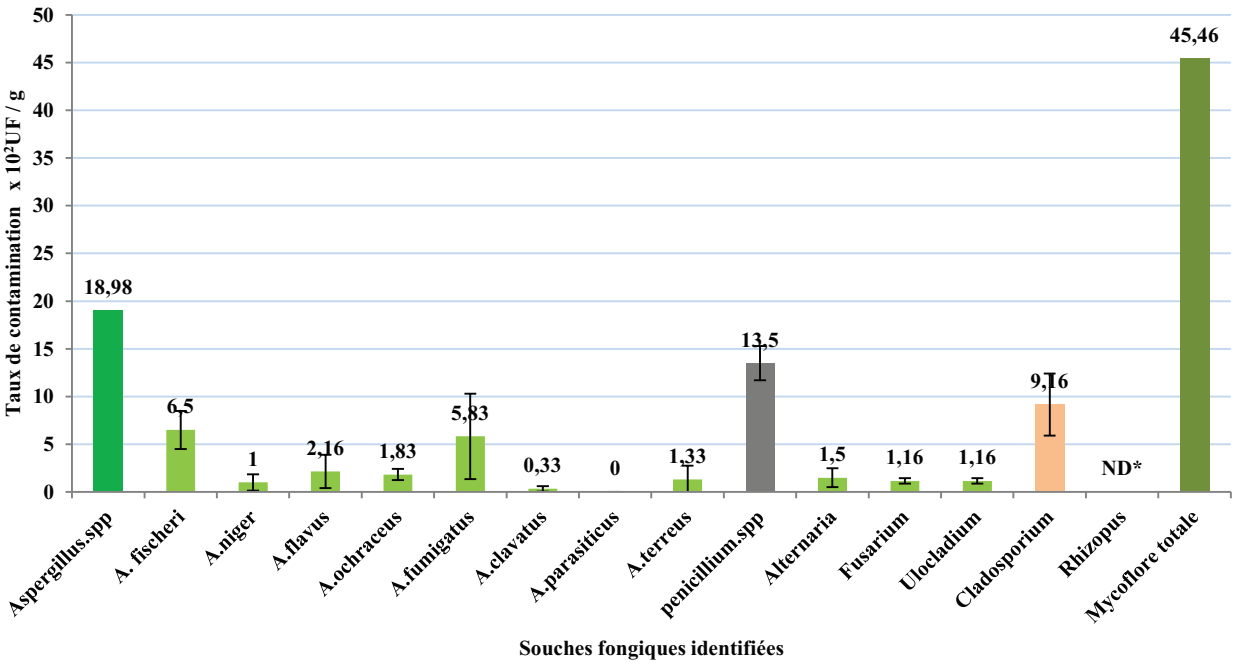


Figure 24. Moyenne de la mycoflore de blé tendre importé détectée sur milieu PDA.

ND* : indénombrable

Sur le milieu CDA, le blé tendre importé présente une mycoflore totale plus élevée que celle du blé local. Elle est respectivement 48.98×10² UF/g et 20.11×10² UF/g (Figure 25 et 26).

La mycoflore de la variété locale est représenté essentiellement par le genre *Aspergillus* dont le taux de contamination est de 11.96×10² UF/g. Il est représenté essentiellement par trois espèces, *Aspergillus flavus* (3.16×10² UF/g), *Aspergillus parasiticus* (2.83×10² UF/g) et *Aspergillus fischeri* (2×10² UF/g) (Figure 25). Ce genre prédomine aussi dans la variété importée ou il est même plus important (42.32×10² UF/g) (Figure 26). En effet ce genre est représenté essentiellement par *Aspergillus ochraceus* (14×10² UF/g), *Aspergillus fumigatus* (13.66×10² UF/g), *Aspergillus flavus* (8.33×10² UF/g), *Aspergillus niger* (3.83×10² UF/g) et *Aspergillus fischeri* (2.5×10² UF/g).

Il ressort aussi de la figure 26 que certaines espèces du genre *Aspergillus* de la variété importée sont absentes, il s'agit d'*Aspergillus clavatus*, *Aspergillus parasiticus* et *Aspergillus terreus*.

Le taux de contamination par le genre *Penicillium* est légèrement élevé dans la variété locale. Il est respectivement de 7.33×10² UF/g et 5×10² UF/g pour celui du local et importé (Figure 25 et 26).

Les figures 25 et 26 démontre l'absence du genre *Ulocladium* sur les deux variétés de blé tendre. Les genres *Alternarias* et *Fusariums* révélé sur les deux variétés de blé tendre sont considérés de la flore du champ et la flore intermédiaire.

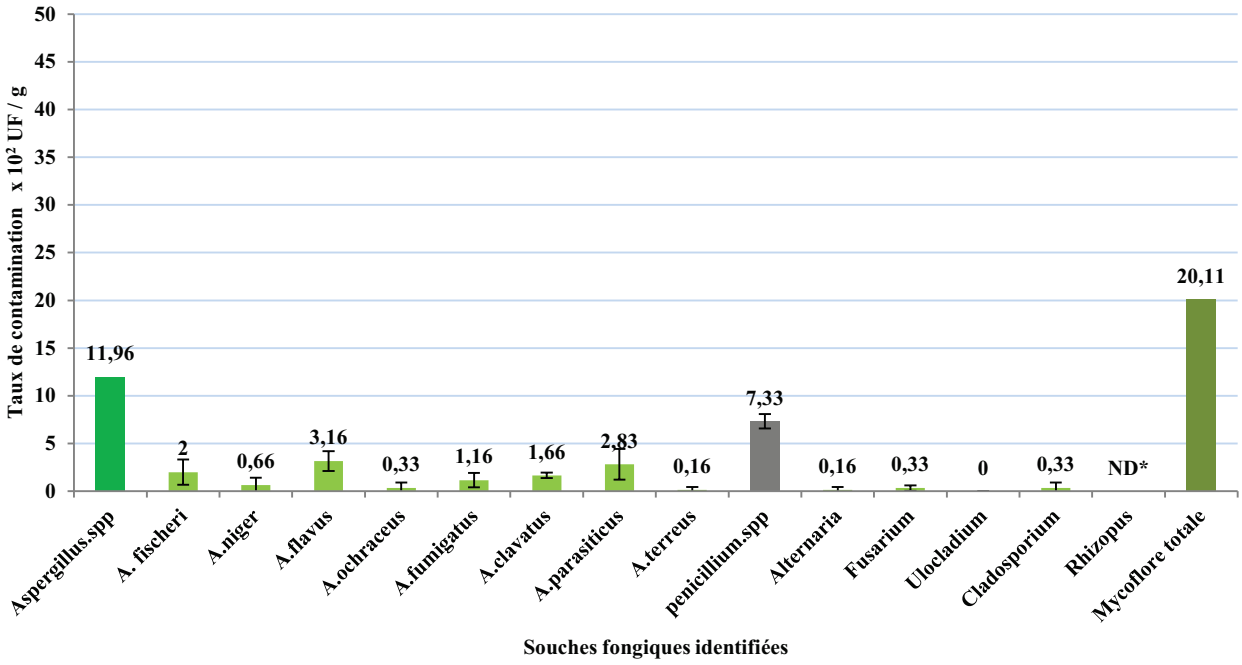


Figure 25. Moyenne de la mycoflore de blé tendre local détectée sur milieu CDA.

ND* : indénombrable

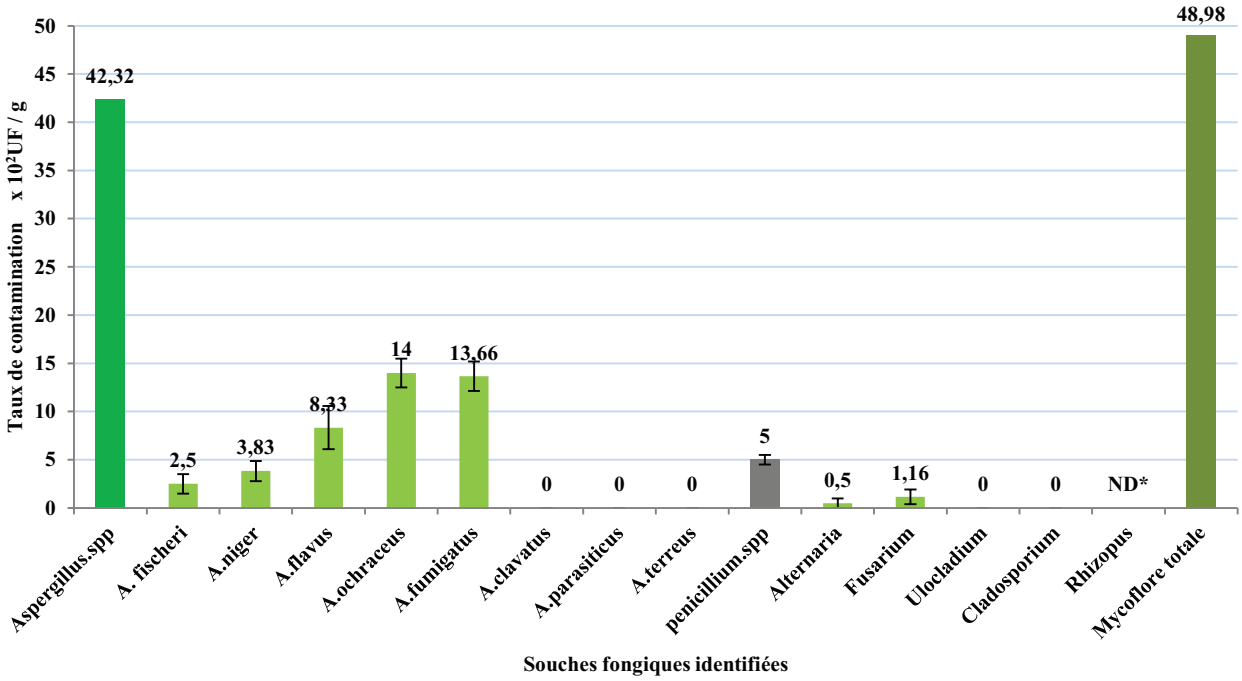


Figure 26. Moyenne de la mycoflore de blé tendre importé détectée sur milieu CDA.

ND* : indénombrable

Les résultats relatifs au milieu DRBC illustrés sur les figures 27 et 28 témoignent environ la même charge fongique pour les deux variétés de blé tendre avec une légère différence entre la diversité des souches fongiques. La moyenne de la mycoflore totale est 8.96×10^2 UF/g pour la variété locale et 9.81×10^2 UF/g pour celle de l'importée.

Les genres les plus prédominants sont les *Aspergillus* et les *Penicillium*. Le taux de contamination par les Aspergillus est de 6.14×10^2 UF/g chez la variété locale (Figure 27) et 6.33×10^2 UF/g chez la variété importée (Figure 28). Le taux de contamination par les Pénicillium est plus élevé chez la variété importée que chez la variété locale. Il est respectivement de 2.16×10^2 UF/g et 0.83×10^2 UF/g (Figure 27 et 28).

Les Aspergillus de la variété locale sont représentés essentiellement par *Aspergillus fumigatus* avec un taux de contamination de 3.83×10^2 UF/g et *Aspergillus flavus* avec un taux de contamination de 1×10^2 UF/g (Figure 27). La variété de blé tendre importée est surtout contaminée par *Aspergillus fumigatus* avec un taux de contamination de 4×10^2 UF/g. Les espèces *Aspergillus parasiticus, A, fischeri* et *A. terreus* sont totalement absentes sur cette variété (Figure 28).

Les genres *Cladosporiums, Alternarias, Ulocladiums* et *Fusariums* détectés sur le blé tendre appartiennent à la flore du champ et la flore intermédiaire. Pour le *Rhizopus,* les même figures (27 et 28) confirment clairement qu'il est difficile de dénombrer ce genre à cause de son aspect cultural.

La comparaison effectuée entre les flores fongiques révélées sur les trois milieux de culture PDA, CDA et DRBC permet de conclure que la flore fongique de la variété locale dénombrée sur le milieu PDA est plus élevée que celle dénombrée sur milieu CDA. Pour la même variété de blé tendre, la flore fongique dénombrée sur milieu DRBC est très inferieure en la comparant avec celles révélées sur les deux autres milieux décrit précédemment.

Pour la variété de blé tendre importé, la flore fongique dénombrée sur milieu CDA est plus élevée que celle dénombrée sur milieu PDA. Sur le milieu DRBC, la moyenne de la mycoflore de la même variété est plus faible en la comparant avec celles dénombrées sur milieu PDA et CDA.

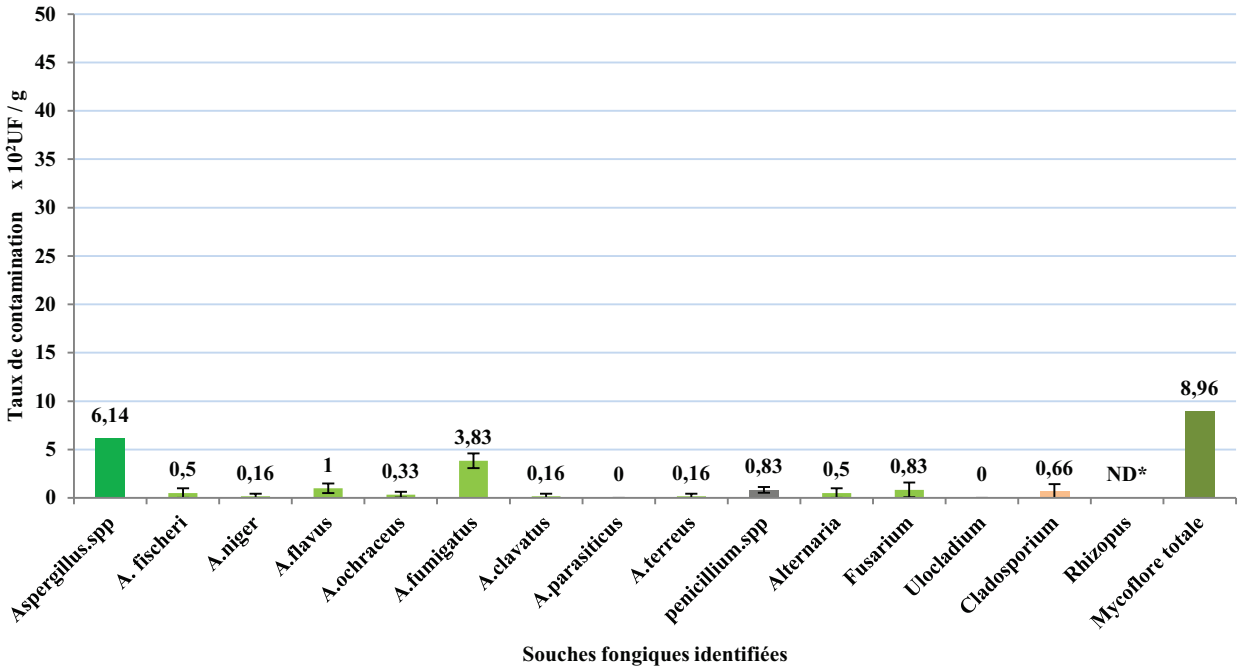


Figure 27. Moyenne de la mycoflore de blé tendre local détectée sur milieu DRBC.

ND* : indénombrable

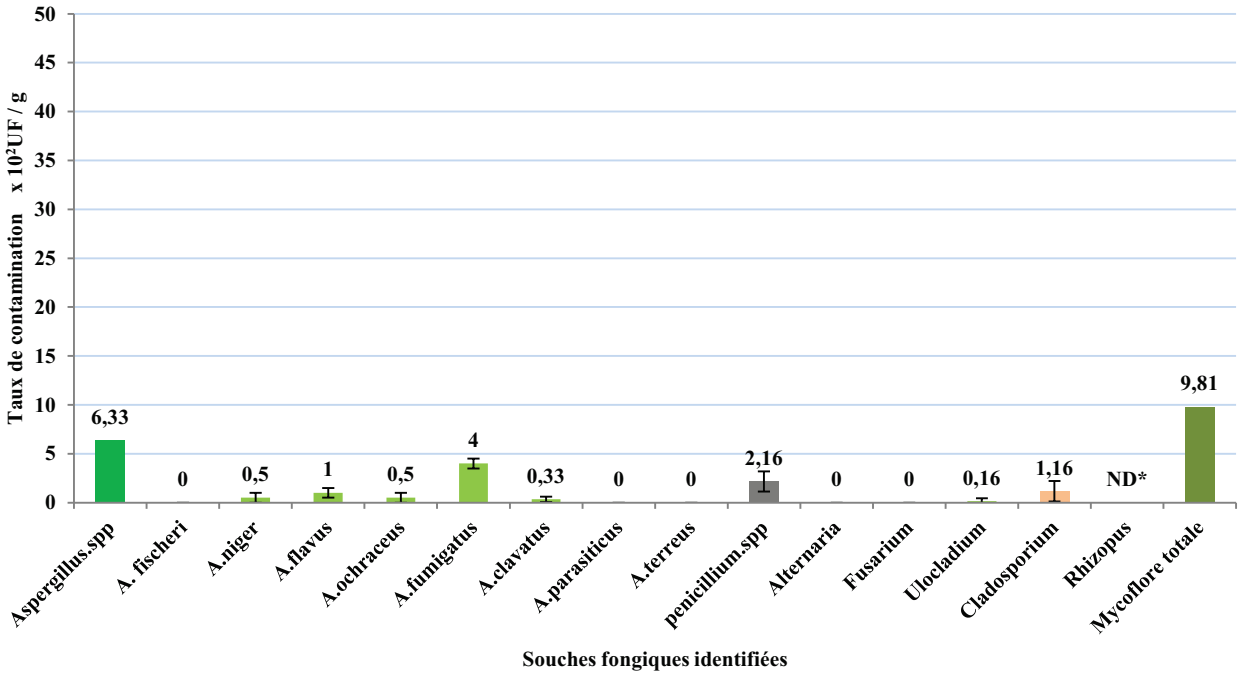


Figure 28. Moyenne de la mycoflore de blé tendre importé détectée sur milieu DRBC.

ND* : indénombrable

II. 1.5. Révélation mycotoxicologiques

a- Révélation des souches productrices de mycotoxines par milieu CEA

Dans cette approche, nous avons appliqué la méthode décrite par **LEMKE** et ***al* (1989)** afin de détecter visuellement les souches productrices de mycotoxines, isolées des deux variétés de blé tendre, directement sur le milieu de culture (CEA).

Les colonies d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus ochraceus* sont obtenues par la méthode de Single Spore après incubation à 25 °C pendant 3 à 7 jours sur milieu CEA (contenant le désoxycholate de sodium à 0,8% comme retardateur de croissance) (Photo 09).

D'après la photo 09, le résultat est présenté par des colonies moyennes de 3 à 40 mm de diamètre. C'est la zone sur laquelle on a essayé de détecter la présence des mycotoxines lors de l'examen visuel sous UV à une longueur d'onde de 365 nm. Ces zones fluorescentes sont spécifiques aux aflatoxines produites par *Aspergillus flavus* et aux ochratoxines produites par *Aspergillus ochraceus*.

b- Révélation des souches productrices de mycotoxines par CCM

La séparation chromatographique sur couche mince permet de confirmer le résultat obtenu avec la technique de **LEMKE** et ***al* (1989)**. Les mycotoxines de types aflatoxine et ochratoxine produites par les souches isolées des deux variétés de blé tendre, développent une fluorescence marquée sur le chromatogramme (Photo 10).

D'après la photo 10, les espèces *Aspergillus flavus* isolées des deux variétés de blé tendre produisent une seule toxine (Aflatoxine B1) qui apparait avec une fluorescence bleue. Les espèces *Aspergillus ochraceus* produisent l'ochratoxine A qui dévoile une fluorescence verte sous lampe UV.

c- Révélation des mycotoxines au niveau des substrats

Le résultat de la détection des mycotoxines niveau du blé tendre local et importé est affiché sur la photo 11.

D'après ce résultat, nous constatons l'absence de spots fluorescents corresponds aux aflatoxines B1 et aflatoxines G1 produites par *Aspergillus flavus* et aux ochratoxines A produites par *Aspergillus ochraceus*. Les deux variétés de blé tendre (local et importé) sont dépourvues de mycotoxines recherchées (Photo 11).

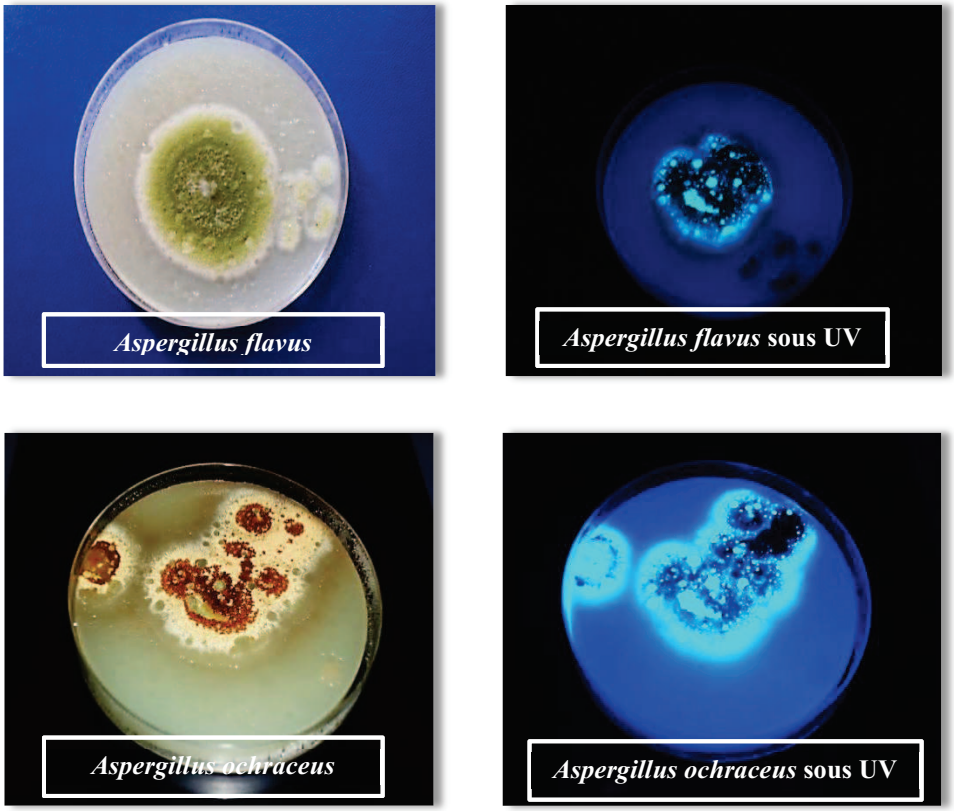


Photo 09. Détection sous UV des souches productrices de mycotoxines sur milieu CEA (photo originale).

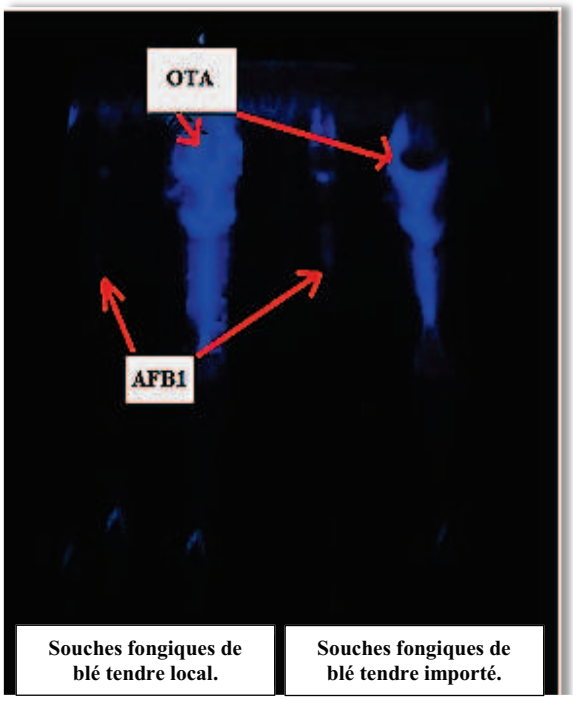


Photo 10. Détection des souches productrices de mycotoxines par CCM (photo originale).

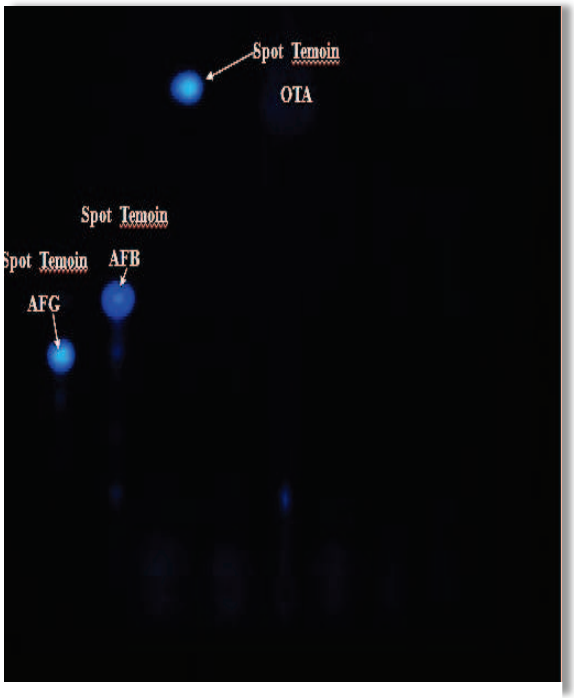


Photo 11. Détection de mycotoxines du blé tendre local et importé (photo originale).

DISCUSSION

L'altération des céréales stockés a fait l'objet de nombreuses études ayant mis en évidence que la contamination fongique compte parmi les principales causes de détérioration des grains de céréales expliquée par des variations dans les paramètres technologiques du grain et par les pertes considérables **(ATALLA et *al.,* 2003 ; MOLINIE et *al*., 2005)**.

Lors de la contamination du blé, les paramètres régulant la croissance fongique et permettant la production de toxines sont nombreux. On cite principalement la charge initiale en mycoflore, la présence de grains brisés, le taux d'humidité relative élevé, le pH et la température de stockage des grains **(ZIA-UR-RAHMAN, 2006)**.

Dans un premier volet, les résultats attribués à la qualité physicochimique indiquent que les prélèvements analysés du blé tendre (local et importé) renferment un pourcentage de grains cassés supérieur au pourcentage fixé par les normes commerciales qui imposent qu'un blé tendre de qualité ne doit pas dépasser un pourcentage de 3% de grains cassés **(MOLINIE et *al*., 2005)**. Cette augmentation dans le nombre des grains cassés pouvait être expliquée par plusieurs facteurs pouvant influencer l'état physique du grain de blé, notamment celui du local, tels que les mauvaises conditions de récolte, les caractéristiques de chaque variété, les défaillances mécaniques des appareils et surtout aux chocs infligés aux grains lors du transport mécaniques aux silos. La présence de grains brisés ne peut que favoriser le développement de foyer de contamination et par conséquent, elle ne peut être que en défaveur d'un stockage de longue durée **(TAHANI et *al*., 2008)**.

L'humidité relative qui est la quantité d'eau libre disponible dans l'échantillon est responsable de plusieurs phénomènes d'altération biologique de l'aliment notamment mycologique. Les faibles teneurs en humidité relative permet dc classer nos échantillons dans la catégorie des produits peu hydratés ; avantage qui n'exclut pas leur contamination par une flore fongique xérotolérante prépondérante **(BELLI et *al.,* 2004)**. Notant que beaucoup de produits pauvres en eau libre non altérables par les bactéries peuvent donc être altérés par les champignons **(DURON, 1999)**.

Le taux d'humidité relative élevé enregistré pour le blé tendre importé peut être dû au transport maritime des blés tendres d'importations et les conditions climatiques des pays d'exportation **(DURON, 1999)**.

Les meures de pH de tous nos échantillons ont révélé un pH légèrement acide à neutre. Selon **DURON (1999)**, les champignons peuvent se développer à des pH compris entre 3 et 8 avec un optimum de croissance compris entre 5 et 6, de ce fait, nos échantillons constituent un milieu favorable pour le développement des champignons.

L'étude de la qualité microbiologique du blé tendre (local et importé) a révélé un taux de contamination totale diffère d'une variété à une autre. Le blé tendre importé présente un taux considérablement élevé sur le milieu organique et minéral par rapport au blé tendre local, ce qui était rapporté dans les travaux de **TAHANI** et ***al*** **(2008)**.

La différence de contamination fongique entre les deux variétés de blé tendre peut être expliquée par la composition biochimique différente du blé tendre importé par apport au blé tendre local. Cette différence est influencée parfois par les conditions climatiques, les conditions de stockage (humidité, température et système de ventilation) et l'installation d'une charge fongique importante, ce qui peut entraîner une modification qualitative et quantitative de la mycoflore **(LE BARS et LE BARS, 1987)**. **MILLER (2002)**, **WILSON** et ***al*** **(2002)**, rapportent que la contamination fongique des céréales au champ ou pendant le stockage est directement lié aux conditions hydrothermiques.

De plus, la variété importée présente un taux d'humidité élevé et selon **BENMANSOUR-BRIXI (2005)**, les moisissures de stockage sont capables de croître sur des substrats contenant 10 à 18 % d'humidité, avec un optimum de croissance compris entre 11 et 13 %. **MULTON (1982)**, **BERTHIER** et **VALLA (1998)**, indiquent que ce développement fongique est favorisé par la relation entre la température et l'humidité.

Les milieux PDA et CDA nous ont donné une croissance variable, cela est peut être expliqué par la différence dans la composition des deux milieux de cultures et le choix des substrats préférés par les souches fongiques, tel que rapporté par l'organisation européenne et méditerranéenne pour la protection des plantes **(OEPP, 2003)**, que le milieu PDA est préparé à base d'élément organique et le milieu CDA est préparé à base d'élément minéral.

La flore fongique totale du blé tendre stocké est constituée essentiellement de moisissures filamenteuses, très sporulantes, dotées d'un grand pouvoir de dissémination dont les genres *Aspergillus* et *Penicillium* sont les plus rencontrés.

C'est genres de moisissures que nous avons pu identifier sont des contaminants des denrées alimentaires maltraitées mais surtout mal conservées, ils sont considérés comme contaminants de stockage des céréales et leurs dérivés **(BERTHIER et VALLA, 1998 ; MULTON, 1982)**.

La dominance du genre *Aspergillus* dans la flore contaminante des céréales a été reportée dans plusieurs travaux **(RIBA et *al.*, 2005 ; LE BARS et LE BARS, 1987)**. Ainsi, les espèces du genre *Aspergillus* sont considérées comme des moisissures de stockage **(WITHLOW et HAGLER, 2001).**

Parmi les espèces fongiques appartenant au genre *Aspergillus*, il faut souligner la grande dominance d'*Aspergillus fumigatus* suivi d'*Aspergillus flavus*. Cette fréquence de contamination importante est accompagnée aussi par une production de mycotoxines. Si cette présence de flore fongique est surprenante, ce n'est pas la première fois qu'une telle contamination est observée. En effet, des enquêtes récentes menées en Italie ont démontré la présence de flore productrice de mycotoxine dans les certaines matières premières et aliments **(PIETRI et *al*., 2004).**

Les autres souches isolées des échantillons analysés appartiennent aux genres *Rhizopus, Alternaria* et *Fusarium* sont naturellement présents sur les cultures au niveau des champs et dans le sol **(WITHLOW et HAGLER, 2001)**. La forte fréquence du genre *Alternaria* dans le blé tendre importé semble être due à l'humidité élevée de cet échantillon **(WEINDENBÖRNER, 2000).**

Le genre *Fusarium* est retrouvé sur les deux variété de blé tendre, ce qui confirme ce résultat les travaux de **CURTUI** et ***al* (1998)**. Ce résultat est aussi en accord avec ceux obtenus dans les pays du nord de l'Europe comme le nord de la France, l'Allemagne, la Norvège, la Belgique, la Pologne ou les Pays-Bas **(ISEBAERT et *al*., 2005 ; KRYSINSKA-TRACZYK et *al*., 2007 ; SCHOLLENBERGER et *al*., 2006).**

Dans l'ensemble, le taux de contamination élevé, ainsi que la biodiversité assez importante constatés dans les différentes variétés du blé tendre peuvent être expliqués probablement par la qualité, la durée et les conditions de stockage **(DAVIS et DIENER, 1987)**.

Du point de vu mycotoxicologique, certaines souches d'*Aspergillus* purifiées et identifiées sont potentiellement toxinogènes **(LEMKE et *al*., 1988)**. L'apparition de la fluorescence autour des colonies d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus ochraceus* cultivées sur milieu CEA après leur examination sous UV, est un indicateur positif pour les souches fongiques productrices de mycotoxines, ce qui est en accord avec les travaux de **LEMKE** et ***al* (1989)**.

L'utilisation du milieu CEA est certainement avantageux dans la présente enquête. Ce milieu est opaque et la blancheur de sa surface est utile en tant que toile de fond pour distinguer les différences entre les colonies. La surface du milieu CEA est également très absorbante de la lumière UV et constitue un arrière-plan efficace pour détecter les zones fluorescentes entourant les colonies correspondant aux aflatoxines et aux ochratoxines. Cette méthode et analogue à la détection des souches fongiques productrices de mycotoxines par chromatographie sur couche mince sous une lumière UV avec l'avantage de cette dernière dans la distinction du type de mycotoxine en la comparant avec le standard de la mycotoxine en question.

Nos résultats mycotoxicologiques obtenus avec la chromatographie sur couche mince démontrent donc, que les souches d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus ochraceus* étaient productrices d'AFB1 et d'OTA, ce qui concorde avec les travaux de **BENMANSOUR-BRIXI (2005)** et **AMROUCHE (2007)**.

Le dosage qualitatif (par CCM) des aflatoxines et des ochratoxines au niveau des échantillons de blé tendre local et importé s'est révélé négatif (absence de mycotoxine dans le substrat) pour l'ensemble des échantillons. L'absence de mycotoxines peut être expliquée soit par la possibilité que les souches d'*Aspergillus* isolées de ces échantillons sont toxinogènes et les conditions de température et d'humidité n'étaient pas favorables à l'écotoxigénèse, soit les taux d'aflatoxines et d'ochratoxines sont inférieurs au seuil de détection de cette méthode qui est de 0.5 ppb (poids par billion) **(ZAKARIA et MAJERUS, 1992)**.

Autrement dit, même si les échantillons analysés contiennent des aflatoxines et des ochratoxines, ces derniers sont peut être à l'état de traces et leur quantité est inférieure à 2ppb (µg/kg) qui constitue le seuil de tolérance des aflatoxines dans les céréales destinées à l'Homme fixé par la communauté européenne en 2001.

CONCLUSION

La présence des grains cassés, dans nos prélèvements, constitue un point d'entrer facile et très probable de plusieurs microorganismes notamment les moisissures attirées par la matière organique présente dans le blé tendre.

Depuis la récolte jusqu'au son arrivé aux silos de stockage, plusieurs paramètres doivent être pris en compte tels que les moyens de transport, les conditions de stockage, le lieu de stockage, le nettoyage des grains, les traitements effectués au niveau des silos et enfin la durée de stockage.

Tous ces paramètres influes considérablement sur le taux des contaminants en particulier les moisissures surtout lorsqu'il s'agit d'un pH qui tend vers l'acidité et d'une humidité relative élevée.

La possibilité d'avoir des souches productrices de mycotoxines est toujours présente mais néanmoins, nos échantillons sont acceptables et ils sont prêts à la consommation.

En général, la précaution doit être toujours maintenue et la démarche assurance qualité doit être suspectée lors de toutes les étapes de la production céréalières depuis la récolte jusqu'au produit fini et surtout au niveau du stockage, la phase la plus sensible et la plus longue.

II. 2. Etude phytochimique des graines de *Citrullus colocynthis*

II. 2.1. Taux d'humidité des graines de *Citrullus colocynthis*

Le résultat de cette analyse a révélé que la poudre des graines de *Citrullus colocynthis* renferme un taux d'humidité inférieure à 10%, soit une valeur de 6.77 %, alors que le taux de la matière sèche est supérieur à 90% (Figure 29).

II. 2.2. Rendements des extractions méthanolique et aqueuse

Le résultat de cette expérimentation a permis l'obtention de deux extraits différents au moins dans leur aspect et leur couleur (Photo 12). Pour l'extrait méthanolique, la couleur ressemblée est le jaune avec un aspect pâteux après l'évaporation du méthanol. Pour l'extrait aqueux, la couleur correspondue est le marron avec un aspect poudreux après l'évaporation de l'eau.

Le calcul du rendement par rapport au poids total de la poudre sèche des graines *Citrullus colocynthis* utilisée dans les deux types d'extractions montre que, la plante a donné des masses en extraits secs supérieures à 1 g / 100 g de graines en poudre. Du point de vue rentabilité en poids, l'extrait méthanolique a donné les proportions les plus élevées en le comparant avec l'extrait aqueux, les proportions sont respectivement 4.89% et 2.70% (Figure 30).

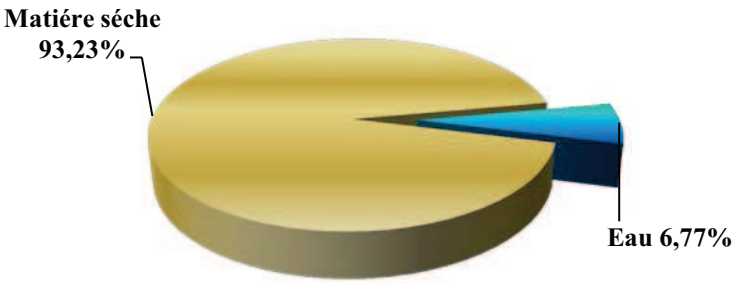


Figure 29. Humidité relative de la poudre des graines sèches de *Citrullus colocynthis*.

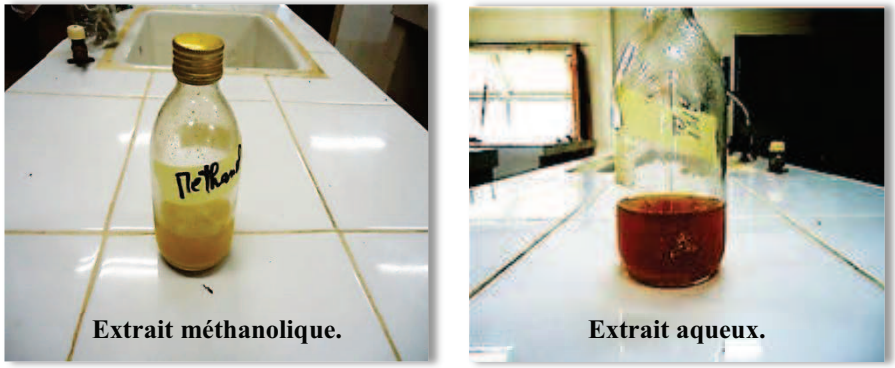


Photo 12. Extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* (photo originale).

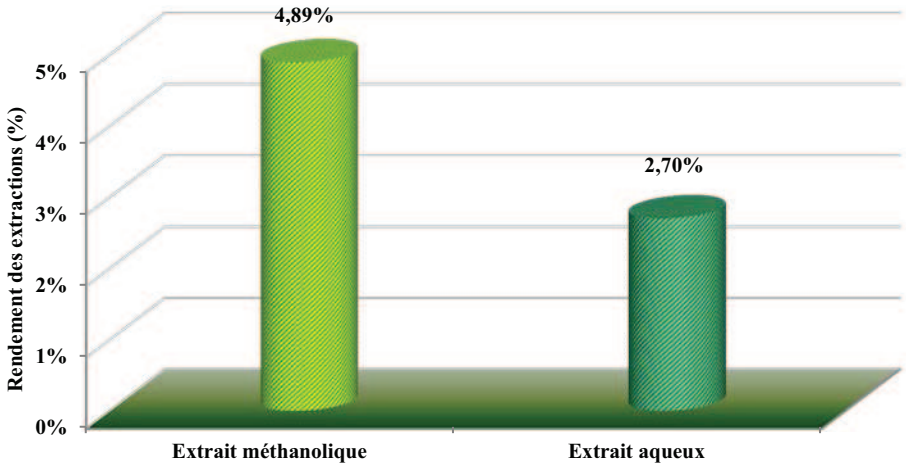


Figure 30. Rendements des extractions méthanolique et aqueux.

II. 2.3. Tests phytochimiques des extraits des graines de *Citrullus colocynthis*

Le résultat des tests phytochimiques effectués sur la poudre des graines *Citrullus colcoynthis* est reporté sur le tableau 10.

Tableau 10. Tests phytochimiques effectués sur les extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colcoynthis.*

Groupes chimiques		Extraits	
		Extrait méthanolique	Extraits aqueux
Polyphénols	Tanins hydrolysables	+	+
	Anthraquinones	+	-
	Flavonoïdes	+	+
	Anthocyanes	-	+
	Coumarines	-	-
	Saponosides	+	+
Terpènes	Stéroïdes	+	+
Alcaloïdes		+	+

Les résultats obtenus révèlent que les deux extraits (méthanolique et aqueux) possèdent presque la même composition chimique. Pour l'extrait méthanolique, la caractérisation chimique a démontré la présence des polyphénols sous forme de tanins hydrolysables, de flavonoïdes, d'anthraquinones et de saponosides alors que les anthocyanes et les coumarines sont entièrement absents (Tableau 10).

Le même extrait (extrait méthanolique) a réagi positivement vis-à-vis du test chimique recherchant les stéroïdes (appartenant au groupe des terpènes) et les alcaloïdes (Tableau 10).

La composition chimique de l'extrait aqueux indique la présence de tous les composés ou familles chimiques retrouvées dans l'extrait méthanolique avec en plus, une quantité indéterminée d'anthocyanes et l'absence d'anthraquinones et de coumarines (Tableau 10).

DISCUSSION

La faible humidité relative des graines de *Citrullus colocynthis* en poudre constitue un avantage pouvant intervenir dans leur conservation. Selon **PARIS** et **MOYSE (1965)**, une bonne conservation est assurée à une humidité relative inferieur ou égale à 10 %.

La méthode d'extraction effectuée sur la poudre des graines de de *Citrullus colocynthis* menée à une température ambiante permet d'extraire le maximum de composés et de prévenir leur dénaturation ou modification probables. En fonction de leur solubilité ou de leur polarité, deux solvants différents ont été utilisés afin de pouvoir extraire les différents phytoconstituents présents dans les graines de cette plante **(YAGOUB, 2008)**.

Il est difficile de comparer les résultats d'extraction avec ceux de la bibliographie. Le rendement n'est que relatif et dépend de la méthode et des conditions dans lesquelles l'extraction a été effectuée **(LEE et *al.*, 2003)**.

Le rendement d'extraction méthanolique que nous avons obtenu est nettement plus faible que ceux obtenus par **MARZOUK** et ***al*** **(2011)**. Par contre, nos résultats d'extraction aqueuse sont similaires à ceux de **MARZOUK** et ***al*** **(2009)** et **(2011)**.

Le screening phytochimique des extraits méthanolique et aqueux révèle que les graines de *Citrullus colcoynthis* sont une source importante de polyphénols. Cette classe regroupe essentiellement les tanins, les flavonoïdes et les saponosides avec l'absence des coumarines dans les deux extraits organiques. Les anthocyanes et les anthraquinones font l'objet de différence entre les deux sortes d'extraits. Les stéroïdes et les alcaloïdes sont également présents dans la composition chimique des deux extraits.

Les résultats obtenus dévoilent la richesse des graines de *Citrullus colocynthis* du point de vue qualitatif en métabolites secondaires tels que les tanins. Ces composés ont été signalés dans le fruit de *Citrullus colocynthis* par **NAJAFI** et ***al*** **(2010)**. **GURUDEEBAN** et ***al*** **(2010)** ont marqué la présence des tannins dans les extraits aqueux et méthanolique de *Citrullus colocynthis*.

Par ailleurs, Le scrennig phytochimique effectué par **ADEBAYO-TAYO** et ***al*** **(2010)** sur le *Citrullus colocynthis* a révélé la présence des tanins et des anthraquinones.

La présence des flavonoïdes dans les deux extraits des graines de *Citrullus colocynthis* est également rapportée par plusieurs auteurs **(NAJAFI et *al.*, 2010 ; GURUDEEBAN et *al.*, 2010 ; ADEBAYO-TAYO et *al.*, 2010 ; AMBI et *al.*, 2007)**. Il s'agit d'une classe très diversifiée ayant une multitude de structures distinctes par leurs propriétés chimiques **(DERBEL et GHEDIRA, 2005)**.

Pour les anthocyanes, ils sont très proches des flavonoïdes **(HENNEBELLE et *al.*, 2004)**. La richesse des graines de *Citrullus colcoynthis* en anthocyane a aussi été signalée par **BENMEHDI (2000)**.

L'existence des saponines dans nos extraits a été rapportée par plusieurs études. Les feuilles et les fruits de *Citrullus colcoynthis* sont riches en saponine (**NAJAFI et *al.*, 2010 ; GURUDEEBAN et *al.*, 2010 ; ADEBAYO-TAYO et *al.*, 2010).**

Plusieurs études ont montré que les terpènes sont largement répandus dans le genre *Citrullus* **(ALI et PANDEY, 2007 ; GURUDEEBAN et *al.,* 2010)**. **ADEBAYO-TAYO** et ***al*** **(2010)** ont révélé leur existence dans les feuilles de cette espèce. Cette classe de métabolite secondaire regroupe également des substances stéroliques qui sont présents sous forme d'alcools libres ou sous forme d'esters associés à d'autres molécules.

Les résultats relatifs au criblage phytochimique de la dernière classe de métabolites secondaires, montrent que les alcaloïdes sont présents dans les deux extraits de graines de *Citrullus colcoynthis.* Ce résultat est confirmé par **AMBI** et ***al*** **(2007)** qui ont détecté les alcaloïdes au niveau des graines de cette espèce et **MARZOUK** et ***al*** **(2010)** qui ont démontré que, les graines de *Citrullus colcoynthis* contiennent 1.64 mg d'alcaloïde par 100g de matière sèche.

La présence des alcaloïdes dans les graines de *Citrullus colcoynthis* indique son intérêt pharmacologique et médicinale tel que signalé par **ISERIN** et ***al*** **(1997)**. Certains de ces métabolites secondaires ont aussi été identifiés, tel que signalé par **DARWISH-SAYED** et ***al*** **(1973)** qui ont pu identifier la présence de trois alcaloïdes dans les graines de cette espèce.

CONCLUSION

La méthode d'extraction à température ambiante permet d'extraire le maximum de molécules bioactives avec une éventuelle protection contre les dénaturations ou les modifications probables des constituants chimiques de la plante.

Les examens phytochimiques effectués sont d'une extrême importance. Ils démontrent que les graines de *Citrullus colocynthis* sont une source privilégiée de molécules biologiquement actives tels que les polphénols, les stéroïdes et les alcaloïdes.

II. 3. Activité biologique des extraits méthanolique et aqueux

II. 3.1. Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux

Les résultats que nous avons obtenus sur l'innocuité du DMSO vis-à-vis *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus ochraceus* sont regroupés dans la photo 13.

D'après ces prises de photos, nous constatons que le solvant utilisé pour solubiliser les fractions obtenues après évaporation du méthanol n'a aucun effet sur la croissance mycélienne des differentes souches fongiques selectionnées. En effet, les differentes souches arrivent à croitre normalement en présence du DMSO dans le milieu de culture (Photo 13).

Les résultats de l'activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* testés séparément *in vitro* sur les souches fongiques sélectionnées sont représentés dans les figures 31, 32, 33 et 34. C'est figures enregistrent les indicent antifongique notés pour chaque concentration d'extrait testée.

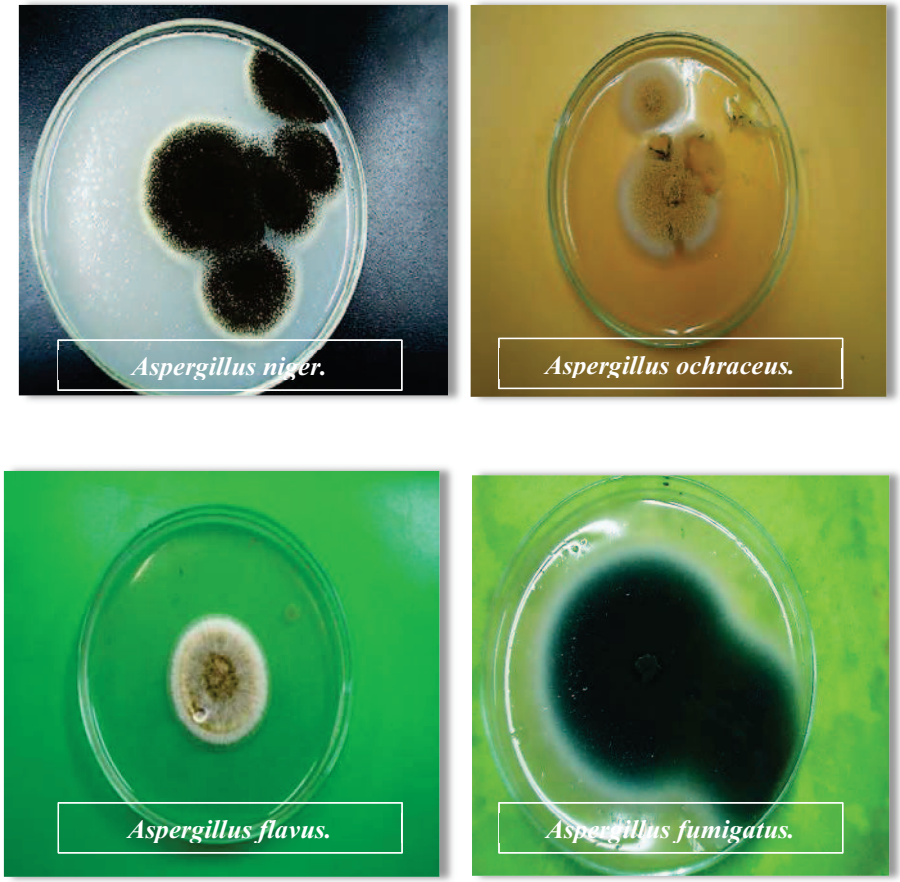


Photo 13. Effet du DMSO sur les différentes souches fongiques.

a- Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus flavus*

Le résultat obtenu avec l'extrait aqueux, testé contre les différentes espèces du genre *Aspergillus* sur milieu PDA par la méthode de micro-dilution, indique une activité antifongique positive sur la quasi-totalité des souches fongiques, à l'exception *Aspergillus flavus* ou l'indice antifongique enregistré est apparu nul pour toute la gamme de concentration effectuée (Figure 31, Photo 15).

Le résultat obtenu avec l'extrait méthanolique dévoile une activité antifongique importante sur la quasi-totalité des souches *Aspergillus* sélectionnées, à l'exception *Aspergillus flavus* qui s'est manifesté plus ou moins résistante avec un indice antifongique maximal de 4.76% noté pour 5% d'extrait méthanolique dans le milieu PDA (Figure 31, Photo 14).

L'extrait méthanolique perd cet effet inhibiteur de la croissance contre *Aspergillus flavus* avec la diminution de sa concentration dans le milieu PDA. D'après la figure 31, en dessous de la concentration 1%, aucun indice antifongique n'est enregistré pour cet extrait.

Les photos 14 et 15 regroupent l'aspect des colonies d'*Aspergillus flavus*. D'après ces photos, la couleur des colonies a changé en présence des différentes concentrations d'extrait méthanolique. Elle vire du vert foncé au vert claire.

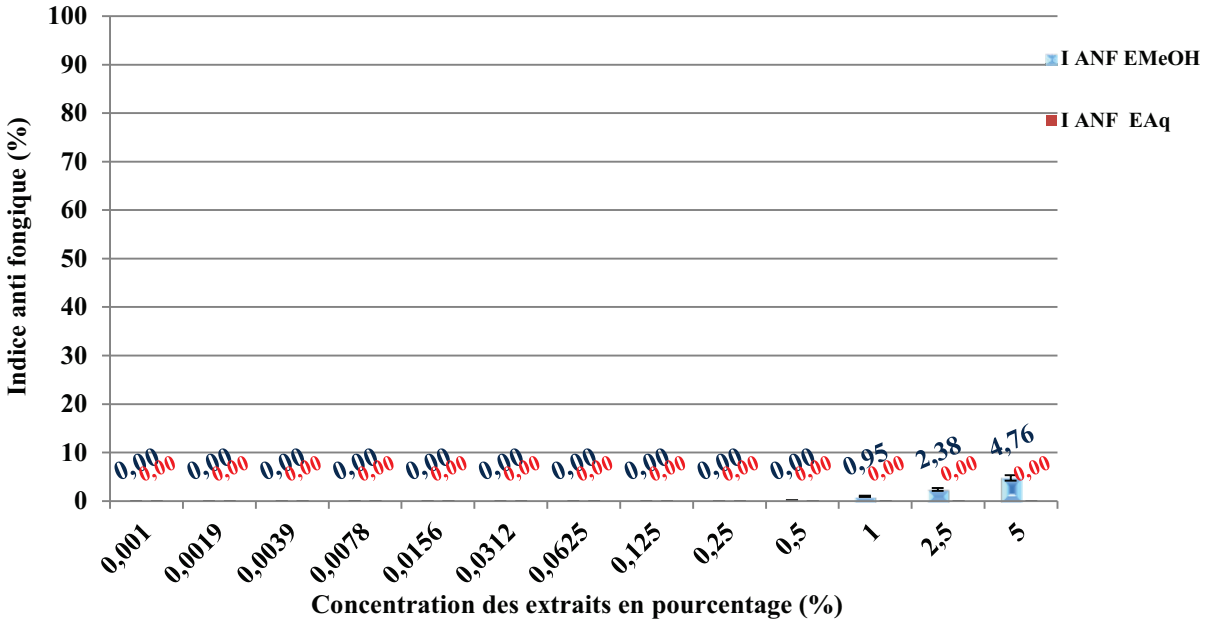


Figure 31. Activité antifongique de l'extrait méthanolique et aqueux sur *Aspergillus flavus*.

I ANF EMeOH : indice antifongique de l'extrait méthanolique.
I ANF EAq : indice antifongique de l'extrait aqueux.

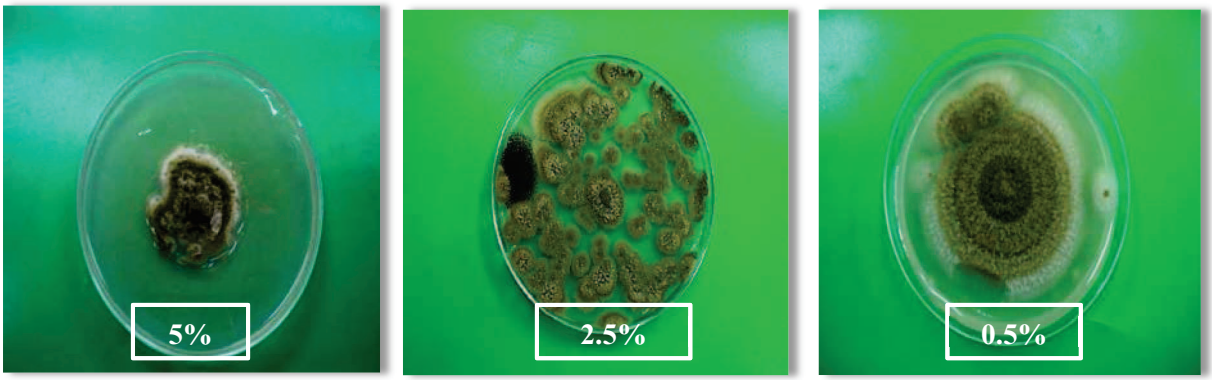


Photo 14. Activité antifongique de l'extrait méthanolique sur *Aspergillus flavus* (photo originale).

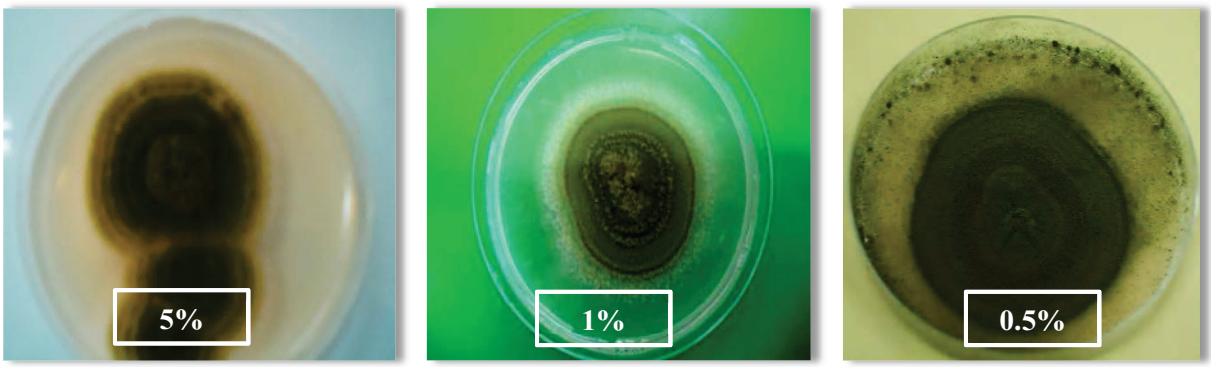


Photo 15. Activité antifongique de l'extrait aqueux sur *Aspergillus flavus* (photo originale).

b- Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus fumigatus*

Pour le deuxième essai effectué sur *Aspergillus fumigatus*, la figure 32 montre d'une part, qu'*Aspergillus fumigatus* est plus sensible à l'extrait méthanolique qu'à l'extrait aqueux et d'autre part, que l'indice antifongique des deux extraits diminue avec la diminution de leur concentration dans le milieu PDA, suggérant une relation directe entre l'activité antifongique et le type et la concentration de l'extrait .

A 5% et 2.5% d'extrait méthanolique, la figure 32 témoigne d'une inhibition totale de la croissance mycélienne ce qui augmente l'indice antifongique à 100%. En dessous de la concentration 2.5%, cet indice antifongique commence à diminuer jusqu'à la concentration 0.0019% ou on enregistre un indice antifongique nul.

Le repiquage des disques mycéliens d'*Aspergillus fumigatus* incapables de croitre dans le milieu PDA contenant 5 et 2.5% d'extrait méthanolique sur d'autres boites contenant le milieu PDA seul n'a donné aucune croissance fongique après 3 à 7 jours d'incubation à 25°C.

La photo 16 illustre les dimensions des colonies d'*Aspergillus fumigatus* aux différentes concentrations d'extrait méthanolique.

L'extrait aqueux enregistre une faible activité antifongique contre *Aspergillus fumigatus* pour toute la gamme de concentrations réalisées. Le maximum d'indice antifongique enregistré est de 16.44% noté pour 2.5% d'extrait. En dessous de cette concentration, l'indice antifongique diminue jusqu'à sa disparition à 0.125% (Figure 32).

La photo 17 démontre la couleur et les dimensions des colonies fongiques qui ont changé en présence d'extrait aqueux dans le milieu PDA. Elle vire du vert foncé au vert claire.

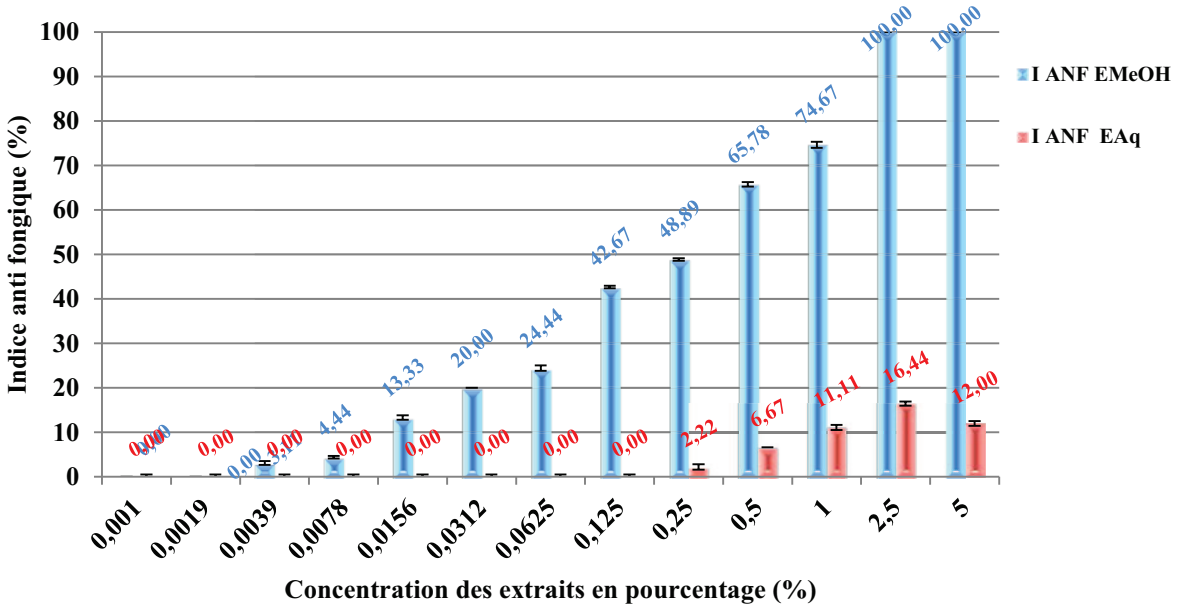


Figure 32. Activité antifongique de l'extrait méthanolique et aqueux sur *A. fumigatus*.

I ANF EMeOH : indice antifongique de l'extrait méthanolique.
I ANF EAq : indice antifongique de l'extrait aqueux.

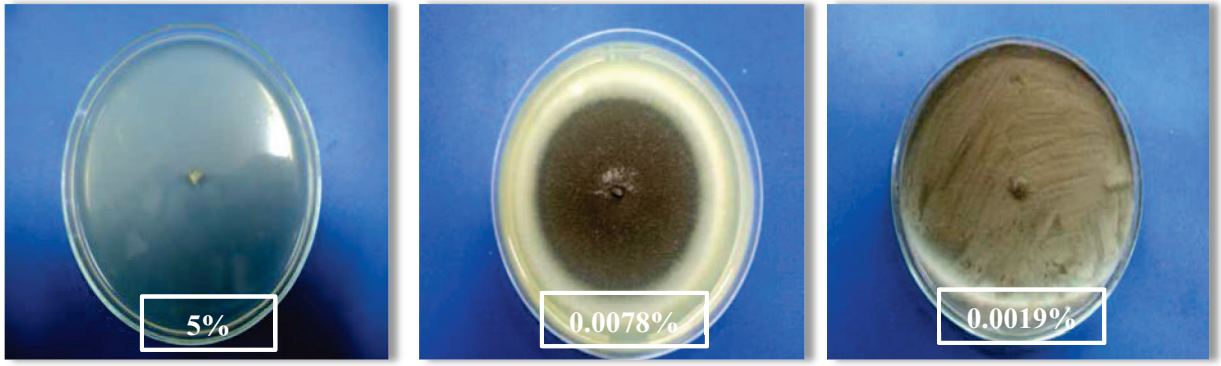


Photo 16. Activité antifongique de l'extrait méthanolique sur *A.fumigatus* (photo originale).

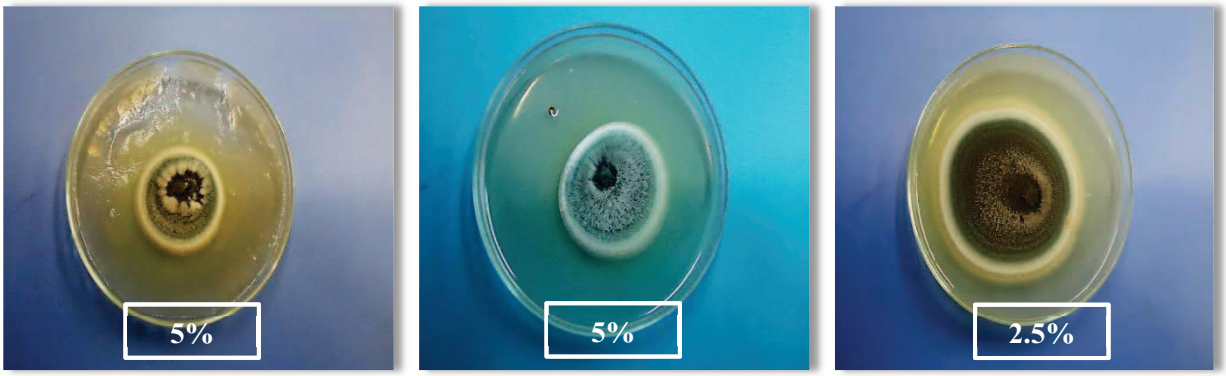


Photo 17. Activité antifongique de l'extrait aqueux sur *A. fumigatus* (photo originale).

c- Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus niger*

Suivant le résultat affiché sur la figure 33, *Aspergillus niger* apparait plus sensible aux deux types d'extraits avec une dissemblance remarquable. Cette sensibilité est en relation proportionnelle avec les concentrations des deux types d'extraits.

Au-delà de la concentration 2.5%, l'extrait méthanolique a entièrement inhibé la croissance mycélienne d'*Aspergillus niger* (Figure 33). Le repiquage de ces disques mycéliens incapables de poursuivre leur croissance sur le milieu PDA contenant l'extrait méthanolique sur d'autre milieu PDA seul n'a donné aucune croissance après 3 à 7 jours d'incubation à 25°C.

En dessous de cette concentration, l'effet de l'extrait méthanolique commence à s'affaibli jusqu'à la concentration de 0.0312% ou on enregistre une disparition complète de son effet (Figure 33). La photo 18 démontre l'activité antifongique de l'extrait méthanolique sur *Aspergillus niger* à différentes concentrations.

L'extrait aqueux a marqué une inhibition importante sur *Aspergillus niger*. A 5%, cet extrait a inhibé près de 50% de la croissance mycélienne. Cet indice antifongique diminue avec la diminution de la concentration de l'extrait dans le milieu jusqu'à 0.125% ou la la croissance mycélienne n'est plus inhibé (Figure 33).

La photo 19 démontre l'effet de l'extrait aqueux sur *Aspergillus niger* à différentes concentrations.

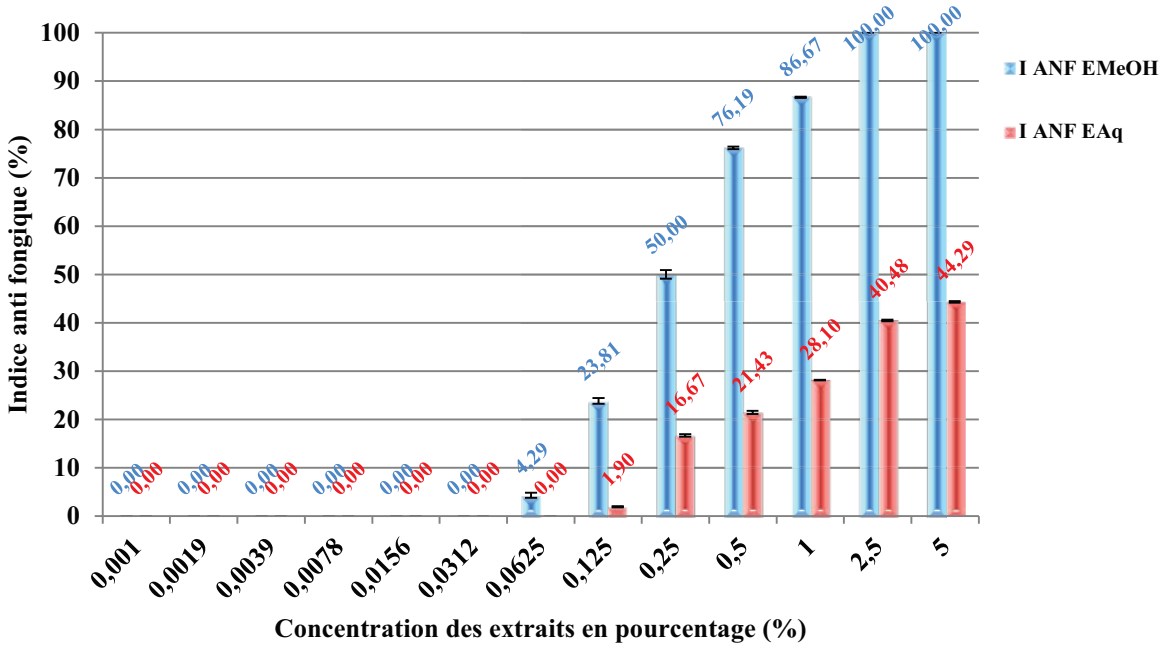


Figure 33. Activité antifongique de l'extrait méthanolique et aqueux sur l'*Aspergillus niger*.

I ANF EMeOH : indice antifongique de l'extrait méthanolique.
I ANF EAq : indice antifongique de l'extrait aqueux.

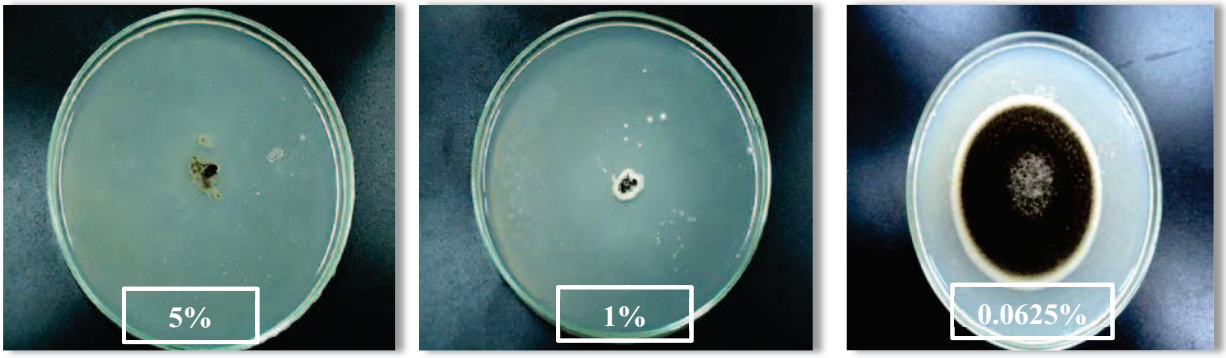


Photo 18. Activité antifongique de l'extrait méthanolique sur *Aspergillus niger* (photo originale).

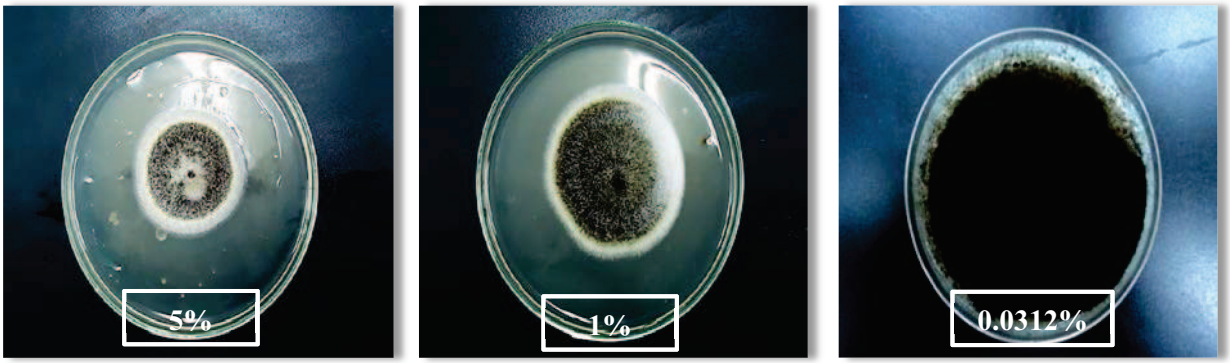


Photo 19. Activité antifongique de l'extrait aqueux sur *Aspergillus niger* (photo originale).

d- Activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus ochraceus*

D'après les résultats affichés sur la figure 34 *Aspergillus ochraceus* s'est présentée très sensible aux deux types d'extraits. L'inhibition de cette espèce fongique est totale à partir de 0.5% pour l'extrait méthanolique et 2.5% pour l'extrait aqueux.

Le repiquage de ces disques mycéliens préalablement traité en présence des deux extraits sur d'autre milieu PDA seul n'a donné aucune croissance après 3 à 7 jours d'incubation à 25°C.. En dessous de ces deux concentrations, l'effet inhibiteur commence à diminué jusqu'à l'absence totale de tout indice antifongique à 0.0039% d'extrait méthanolique et 0.0156% d'extrait aqueux.

Les photos 20 et 21 démontrent l'activité antifongique à différentes concentrations d'extraits méthanolique et aqueux sur *Aspergillus ochraceus*.

La comparaison de la sensibilité des différentes souches fongiques aux deux extraits (méthanolique et aqueux) révèle que *Aspergillus ochraceus* est la plus sensible avec un indice antifongique de 100 % marqué pour les deux types d'extraits suivie d'*Aspergillus niger* et *Aspergillus fumigatus* qui n'ont développé aucune résistance en présence d'extrait méthanolique, alors que pour l'extrait aqueux la croissance mycélienne des deux souches fongiques était seulement ralentie. Pour *Aspergillus flavus,* les deux types d'extrait n'ont pas inhibé la croissance fongique de cette espèce.

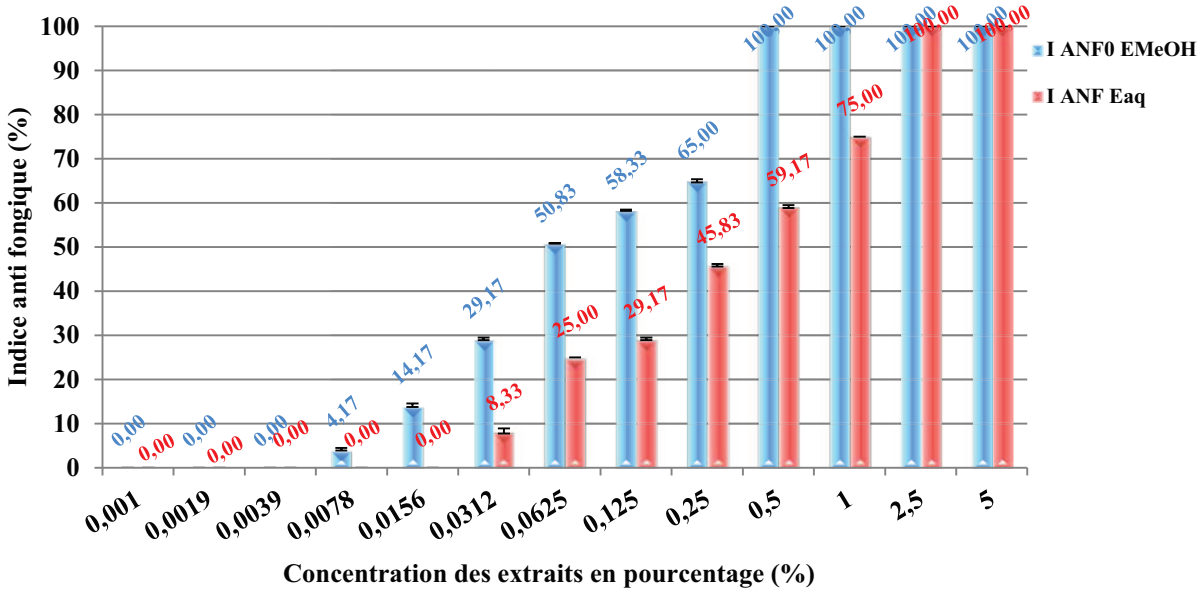


Figure 34. Activité antifongique de l'extrait méthanolique et aqueux sur *Aspergillus ochraceus*.

I ANF EMeOH : indice antifongique de l'extrait méthanolique.
I ANF EAq : indice antifongique de l'extrait aqueux.

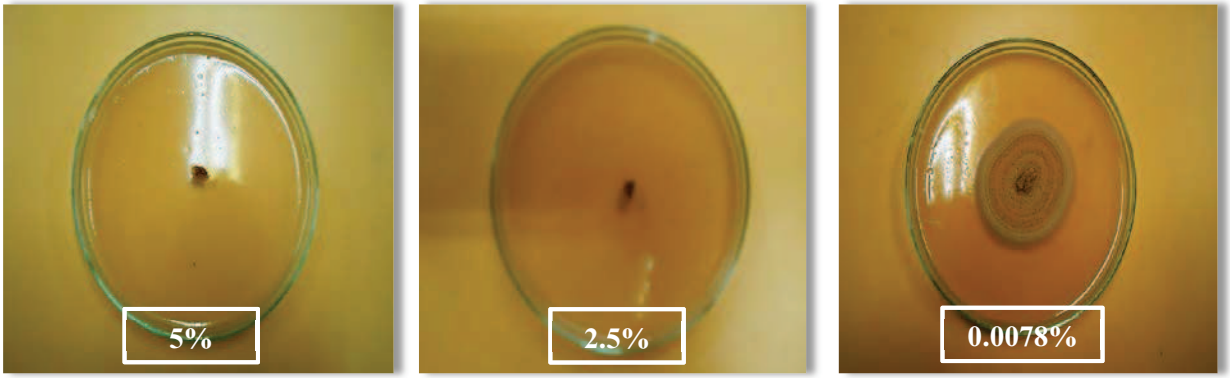


Photo 20. Activité antifongique de l'extrait méthanolique sur *A.ochraceus* (photo originale).

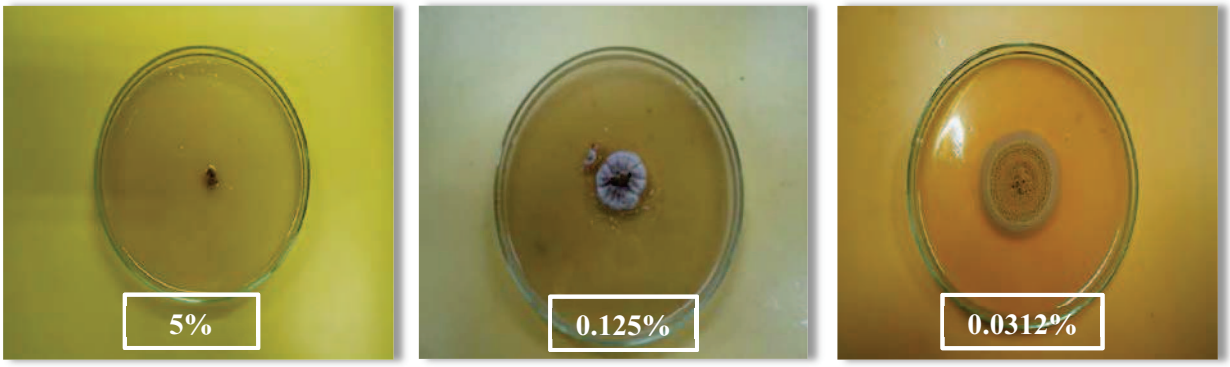


Photo 21. Activité antifongique de l'extrait aqueux sur *A.ochraceus* (photo originale).

II. 3.2. Activité antimycotoxinogéne des extraits méthanolique et aqueux

a- Effet des extraits méthanolique et aqueux sur la biomasse fongique formée

Le résultat de l'effet des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur les biomasses mycéliennes d'*Aspergillus flavus* et d'*Aspergillus ochraceus* formées en milieu liquide est illustré dans les figures 35 et 36.

Ces figures font ressortir les poids des biomasses mycéliennes formées par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* en fonction des différentes concentrations des extraits méthanolique et aqueux

Selon les résultats, Les deux types d'extraits exercent un effet remarquable sur la croissance mycélienne d'*Aspergillus ochraceus,* influençant négativement la biomasse mycélienne formée qui diminue avec l'augmentation de la concentration des extraits dans les milieux (Figure 35 et 36). Par ailleurs, on assiste à une réduction de biomasse mycélienne de l'ordre de 95% en présence de l'un des deux extraits (Figure 35 et 36).

La souche *Aspergillus flavus* s'est révélée plus résistante que la précédente vu que la production de biomasse mycélienne par cette dernière n'a pas été perturbée en présence des deux extraits testés (Figure 35 et 36).

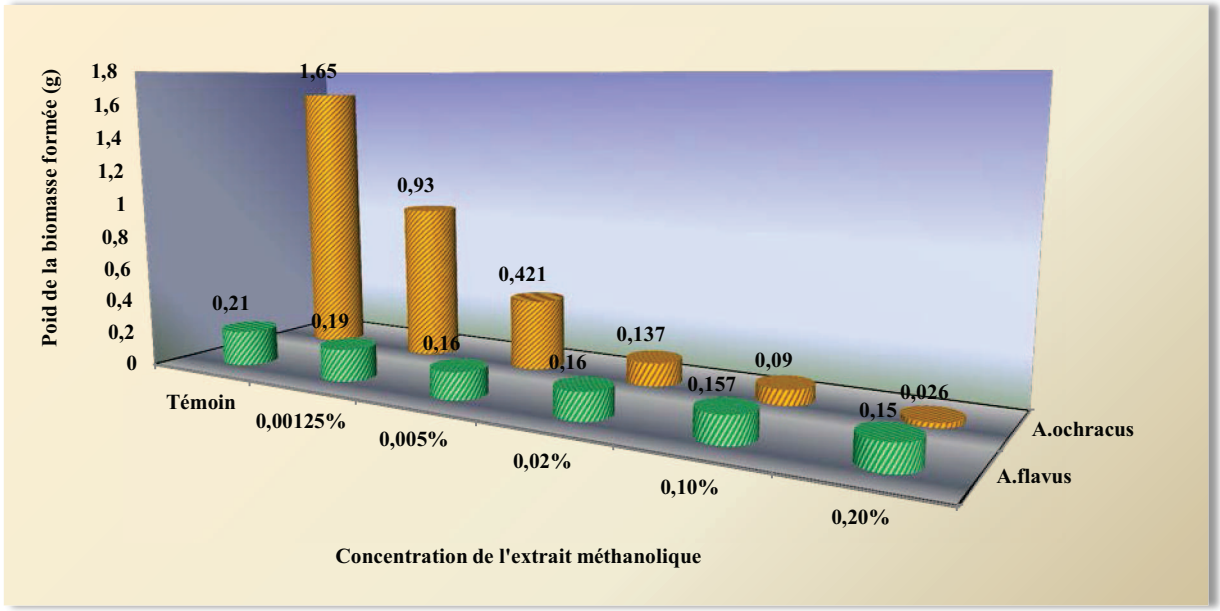


Figure 35. Biomasses fongiques formées par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* en présence et en absence d'extrait méthanolique.

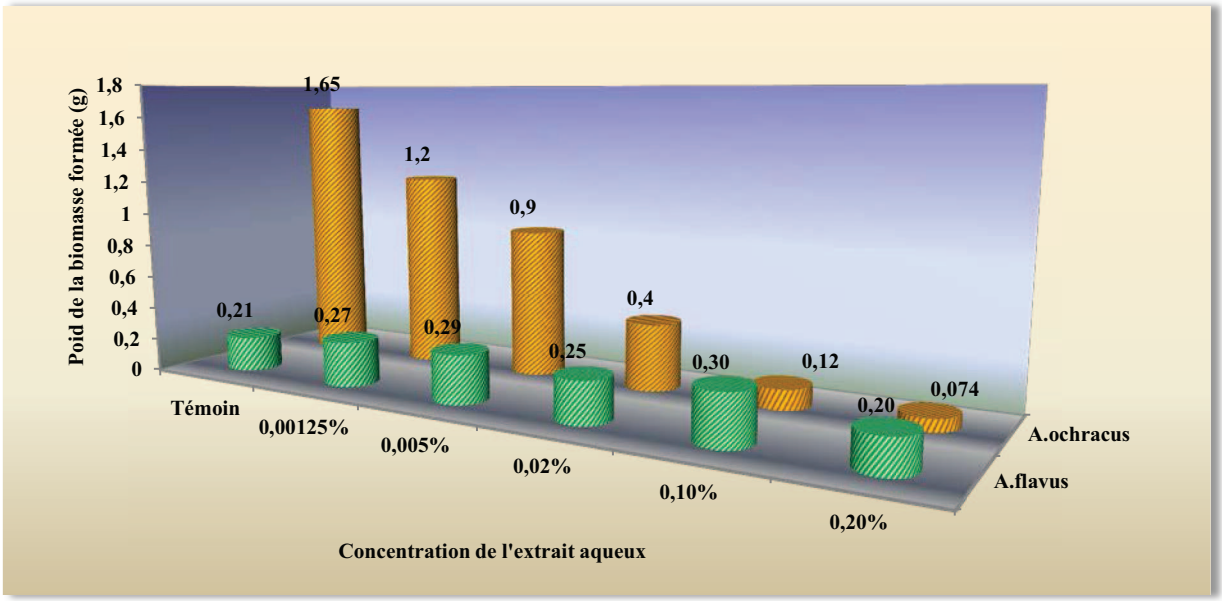


Figure 36. Biomasses fongiques formées par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* en présence et en absence d'extrait aqueux.

b- Effet des extraits méthanolique et aqueux sur la synthèse de l'AFB1 et l'OTA

Les résultats de la dernière tentative démontrant l'effet des extraits méthanolique et aqueux sur la synthèse des mycotoxines révélé par la chromatographie sur couche mince sont présentés sur la photo 22.

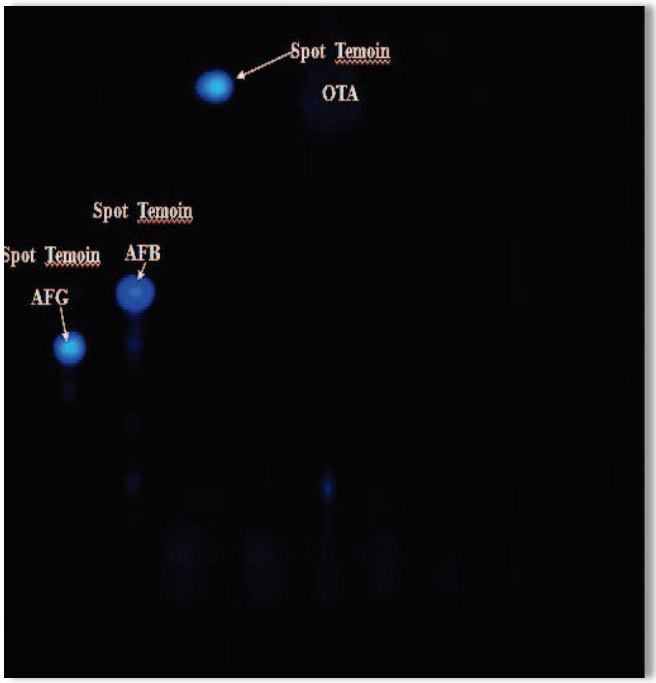
D'après les photos A et B, la synthèse d'aflatoxine B1 et d'ochratoxine A produites respectivement par *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* est inhibée dans la quasi-totalité des concentrations d'extraits testées dans le milieu YES.

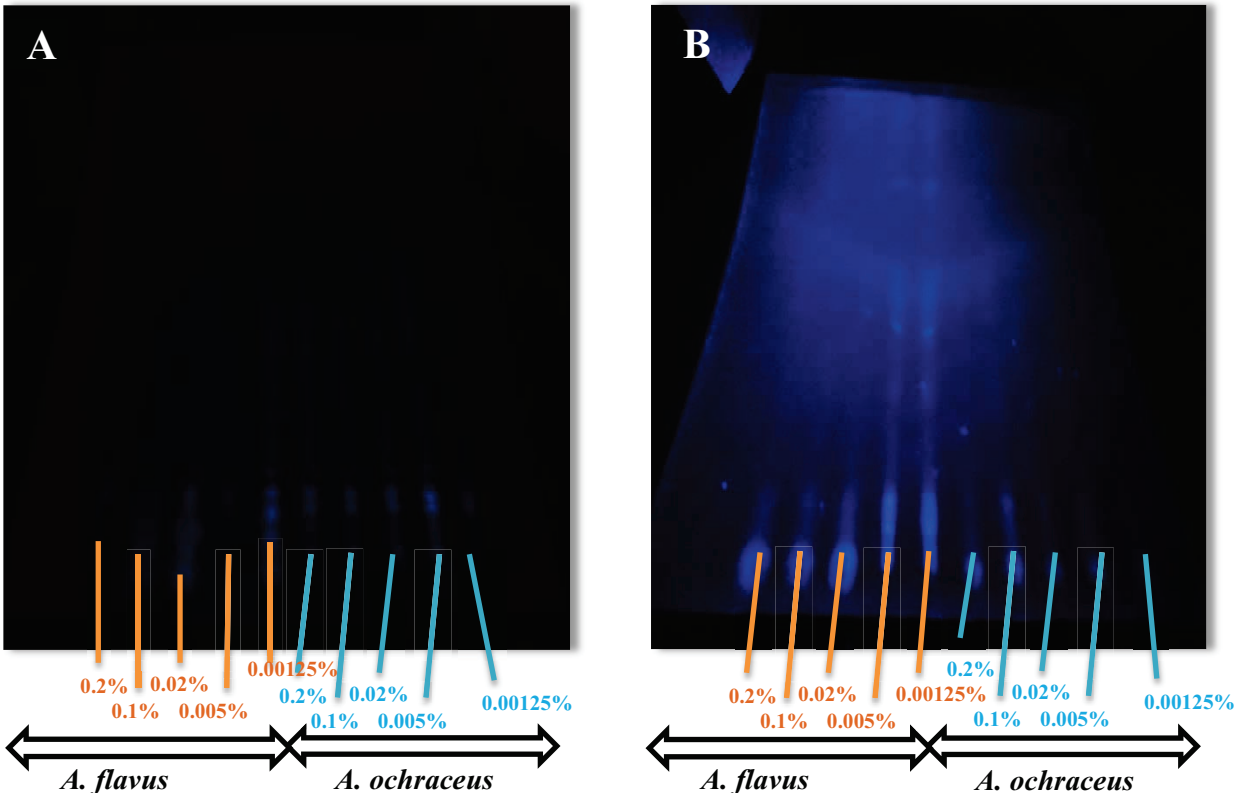
Les différentes concentrations finales obtenues avec les deux types d'extraits ont totalement inhibé la synthèse d'ochratoxine A. La synthèse d'aflatoxine B1 produite par *Aspergillus flavus* est-elle même inhibée aux différentes concentrations obtenues avec l'extrait méthanolique. Cependant, La chromatographie sur couche mince a révélé la présence d'AFB1 dans le milieu YES aux faibles concentrations d'extrait aqueux (0.00125% et 0.005%) (Photo 22).

DISCUSSION

La recherche des effets antifongiques de la coloquinte sur les souches rencontrées dans le blé tendre stockés a révélé une efficacité des extraits aqueux et méthanolique des graines de cette plante sur la majorité des souches fongiques sélectionnées, ce qui confirme que les substances bioactives des plantes sont considérées comme des composés non phytotoxiques et potentiellement efficaces contre les champignons pathogènes **(PRABAVATHY et *al.*, 2006 ; CHANG et *al.*, 2008)**. Le développement de la sécurité des agents antifongiques pour le contrôle des phytopathogènes dans l'agriculture connait une place importante dans la recherche **(FIELD et *al.,* 2006 ; LEE, 2007)**.

La présente expérimentation révèle que l'extrait méthanolique des graines de *Citrullus colocynthis* possède un effet plus antagoniste que l'extrait aqueux. En effet, l'extrait méthanolique a démontré un remarquable effet fongicide contre *A. fumigatus, A. niger* et *A. ochraceus* isolées du blé tendre, expliqué par l'absence de croissance fongique après le repiquage des disques dans les milieux PDA seul. Ces concentrations inhibant totalement la croissance mycélienne de ces souches fongiques sont les concentrations minimales fongicides (CMF). Toutefois, *Aspergillus flavus* a montré une résistante même à des concentrations élevées d'extraits.





A : Extrait méthanolique. **B : Extrait aqueux.**

Photo 22. Activité antimycotoxinogéne des extraits des graines de *Citrullus colocynthis* (photo originale).

L'absence d'inhibition totale de la part d'extrait aqueux est expliquée par le fait que la concentration fongicide ou fongistatique est supérieure aux concentrations effectuées dans cette étude.

La forte activité antifongique de l'extrait méthanolique a aussi été rapportée par **HADIZADEH** et ***al*** **(2009)** qui ont démontré que les extraits alcooliques de *Citrullus colocynthis* possèdent une bonne activité antifongique. **GURUDEEBAN** et ***al*** **(2010)** ont signalé que l'extrait méthanolique des parties aériennes de *Citrullus colocynthis* est menu d'une importante activité antifongique sur *Aspergillus fumigatus* alors que l'extrait aqueux n'a aucune activité antifongique sur cette souche. En outre, *Aspergillus flavus* s'est révélé résistante aux deux types d'extraits. Ces deux souches fongiques sont moins résistantes en présence d'extrait éthanolique.

Les effets antifongiques des extraits aqueux et méthanolique des graines de la coloquinte peuvent être attribués aux différentes substances phytochimiques détectées lors du screening phytochimique. Dans leur étude, **ABDEL GHANI** et ***al*** **(2008)** mettent aussi en relation l'activité antifongique des extraits des graines de *Citrullus colocynthis* avec les substances bioactives de la plante. La tendance de ces substances phytochimiques d'avoir une activité plus élevée sur l'ensemble des souches est en fonction de leurs concentrations dans les extraits **(FOGLIANI et *al*., 2005 ; YAN et *al*., 2008).**

L'importance de ces familles phytochimiques est influencée par la répartition géographique de *Citrullus colocynthis*, ce qui influe par la suite sur leurs activités biologiques. L'activité antimicrobienne des extraits dépend donc de la plante, de sa composition, de l'organe végétal à tester, de la nature de l'extrait et de la souche à étudier **(GRAVEN et *al*., 1992)**.

Parmi les substances phytochimiques douées d'une activité antifongique, on cite principalement les alcaloïdes, les flavonoïdes, les polyphénols et les stéroïdes **(IROBI et DARANOLA, 1994 ; BRANTNER et *al.,* 1996 ; YAN et *al*., 2008)**.

Les travaux de **SCALBERT (1991)** et **BANSO** et **ADEYEMO (2007)** ont démontré que les tanins isolés des plantes médicinales possèdent une activité toxique contre les champignons.

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)**.

Plusieurs études ont été menées pour comprendre le mécanisme d'action des extraits de plantes. Plusieurs chercheurs attribuent cette fonction aux composés phénoliques. Ces composés peuvent interférer avec les biomembranes en causant des dommages cellulaires et provoquant la fuite de matériaux cellulaires et finalement la mort des microorganismes **(MSHVILDADZE et *al*., 2000 ; VELDHUIZEN et *al*., 2006 ; ABDEL GHANI et *al*., 2008)**. C'est un mécanisme possible par lequel la croissance mycélienne peut être réduite ou totalement inhibée par l'effet des extraits en agissant sur la fonctionnalité et la structure de la membrane cellulaire **(SIKKEMA et *al*., 1995)**.

Les composants des extraits tels que les terpènes affectent non seulement la perméabilité mais aussi d'autres fonctions dans les membranes cellulaires. Ces composés peuvent traverser les membranes cellulaires, pénètrent ainsi à l'intérieur de la cellule et interagissent avec des sites critiques intracellulaire tels que les enzymes et les protéines, ce qui conduit à la mort cellulaire. **(OMIDBEYGI et *al.,* 2007 ; CRISTANI et *al.,* 2007)**,

Selon **FARAG** et ***al*** **(1989)**, la présence des groupements OH dans les composés phénoliques est capable de former des liaisons hydrogènes avec les sites actifs des enzymes et d'accroître l'activité antimicrobienne.

Les flavonoïdes sont également responsables de l'inhibition des microbes résistants aux antibiotiques **(LINUMA et *al*., 1994)**. Ils sont responsables des processus de balayage ou chélateurs et peuvent également perturber les membranes microbiennes **(KESSLER et *al.,* 2003)**. Par ailleurs, les alcaloïdes renferment un effet détoxifiant et possèdent une très bonne activité antifongique **(ZEE-CHENG, 1997)**.

Selon **SADIPO et *al* (1991),** les tannins sont responsables de la précipitation des protéines indispensables des micro-organismes.

L'avantage des extraits de plantes est donc leur bioactivité, une caractéristique qui les rend attrayants pour la protection des produits stockés tels que les grains de céréales contre l'attaque des champignons et même le blocage de leur écotoxigénèse **(TRIPATI et DUBEY, 2004)**.

Les extraits obtenus à partir des parties supérieures de plantes possèdent la capacité de supprimer la croissance des champignons toxinogènes et par conséquent, la production de toxines dans les supports synthétiques **(THANABORIPAT et *al*., 1997 ; BHATNAGAR et MCCORMICK, 1988)**. Ils peuvent aussi bloquer entièrement la biosynthèse des mycotoxines alors que la croissance fongique n'est pas affecté **(BHATNAGAR et MCCORMICK, 1988).**

L'inhibition de la synthèse des mycotoxines en présence d'extraits est due essentiellement aux composés phytochimique. L'étude effectuée par **SIDHU** et ***al*** **(2009)** révèle que La combinaison d'huile essentielle de Citronnelle avec de l'extrait méthanolique de *Citrullus colocynthis* inhibent jusqu'à 90% de la production d'aflatoxine, y compris l'AFB1 alors que d'autres combinaisons n'inhibaient que près de 70% des aflatoxines**.**

HUA et *al* (1999) rapportent que les composés phénoliques inhibent au début plutôt qu'à la fin les étapes de la voie de biosynthèse d'AFB1. **GHORBANIAN** et ***al*** **(2008)** rapportent que l'inhibition de la synthèse des aflatoxines est en relation avec le temps de contact et la dose de l'extrait.

Le dépistage d'agents bioactifs à partir des plantes est l'un des axes les plus intensif dans la recherche des produits naturels aujourd'hui, car l'activité des extraits de plantes présente un grand intérêt en particulier contre les souches multi résistantes, mais le domaine est loin d'être épuisé et seulement 10% de toutes les plantes avaient été étudiées en détail pour leur agents bioactifs **(ABDEL-GHANI et *al*., 2008)**.

Citrullus colocynthis peut également être utilisée comme un facteur de premier plan dans un large éventail d'activités contre de nombreux phytopathogènes, où ces pathogènes ont développé une résistance contre les fongicides spécifiques (idazoles benzim, dicarboximides, diethofuncarband et les inhibiteurs de la biosynthèse des stérols) **(ELAD, 1991).**

CONCLUSION

L'étude de l'activité antifongique des extraits des graines de *Citrullus colocynthis* par la méthode de micro-dilution en milieu solide a révélé que les deux extraits méthanoliques et aqueux possèdent une remarquable activité antifongique liée à leur richesse en composés bioactifs largement répandus dans les plantes médicinales. L'extrait méthanolique possède une activité fongicide sur la majorité des souches fongiques sélectionnées à l'exception d'*A. flavus* qui s'est révélée résistante. L'extrait aqueux a démontré son effet fongicide uniquement sur *A. ochraceus*.

Les extraits bruts des graines de Citrullus colocynthis testés montrent une activité antimycotoxinogène élevée puisqu'ils ont pu atteindre les sites de synthèse des toxines. Les deux extraits ont inhibé la synthèse d'ochratoxine A produite par *Aspergillus ochraceus* et d'aflatoxine B1 produite par *Aspergillus flavus* malgré que les deux types d'extraits n'ont pas affecté la croissance de cette dernière.

Les extraits des graines de *Citrullus colocynthis* peuvent constituer donc une nouvelle stratégie de décontamination pour la lutte contre les mycotoxines.

Conclusion générale et perspectives.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de notre étude, menée sur l'activité antifongique et antimycotoxinogéne des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur quelques souches isolées du blé tendre stocké, le premier objectif identifié fut l'étude de la qualité physicochimique, microbiologique et mycotoxicologique du blé tendre local et importé stocké à l'OAIC de la wilaya de Saida.

Pour répondre à cet objectif, un échantillon représentatif de chaque variété de blé a été analysé.

Selon les analyses mycologiques, la charge fongique la plus élevée est celle du blé tendre importé, qui représente un substrat très favorable pour la croissance des moisissures vu sa teneur en eau élevée provenant du transport maritime.

Le genre *Aspergillus* représenté par différentes espèces a été retrouvé dans les deux variétés analysés avec une fréquence et une abondance élevée suivi de *Penicillium* et *Cladosporium* qui sont peu fréquents et enfin, le genre *Fusarium* qui est le moins fréquent. Parmi les espèces du genre *Aspergillus*, deux espèces ont été révélées productrices de mycotoxines.

La recherche d'aflatoxine B1 (AFB1) et d'ochratoxine A (OTA) sur les différents substrats analysés s'est révélée négative. L'absence des aflatoxines et des ochratoxines sur le blé tendre local et importé malgré la présence des souches productrices de ces toxines pourrait être expliquée par les conditions d'un environnement défavorable pour la synthèse de ces dernières.

Pour répandre au second objectif évaluant l'activité biologique des extraits des graines de la coloquinte, des examens phytochimiques ont été effectués. Ils démontrent que les graines de *Citrullus colocynthis* sont une source privilégiée de molécules biologiquement actives, parmi ces composés on cite les polyphénols représentés par les tanins hydrolysables, les anthraquinones, les flavonoïdes, les anthocyanes et les saponosides. Les stéroïdes et les alcaloïdes y sont aussi présents.

L'étude de l'activité antifongique des extraits des graines de *Citrullus colocynthis* a révélé que les deux extraits, méthanolique et aqueux, possèdent une activité antifongique liée à leur richesse en composés bioactifs largement répandus dans les plantes médicinales. L'extrait méthanolique possède une activité fongicide sur la majorité des souches fongiques sélectionnées à l'exception d'*A. flavus* qui s'est révélée résistante. L'extrait aqueux a démontré son effet fongicide uniquement sur *A. ochraceus.*

Les extraits bruts des graines de *Citrullus colocynthis* testés montrent une activité antimycotoxinogène élevée puisqu'ils ont pu atteindre les sites de synthèse des toxines. Les deux extraits ont inhibé la synthèse d'ochratoxine A produite par *Aspergillus ochraceus* et d'aflatoxine B1 produite par *Aspergillus flavus* malgré que les deux types d'extraits n'ont pas affecté la croissance de cette dernière. Les extraits des graines de *Citrullus colocynthis* peuvent donc constituer une nouvelle stratégie de décontamination pour la lutte contre les mycotoxines.

A l'issue de cette étude et afin d'élucider certains points restés peu claires, il apparait nécessaire d'effectuer d'autres études approfondies qui se résument dans les points suivants :

- Identification moléculaire des souches fongiques isolées du blé tendre pour connaitre leur origine et leur toxicité (et même la possibilité de mutation).

- Une étude *in vivo* pour obtenir une vue globale sur l'activité antifongique des extraits de graines de *Citrullus colocynthis* testés.

- Extraction et caractérisation des composés actifs par des méthodes plus spécifiques

- Réalisation d'une étude toxicologique avant l'application des extraits au niveau des silos de stockage.

Références bibliographiques.

A

1) **ABDEL GHANI, S.B., WEAVER, L., ZIDAN, Z.H., HUSSEIN, M.A., KEEVIL, C.W. & BROWN, R.C.D., 2008.** Microware-assisted synthesis and antimicrobial activities of flavonoid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **18,** 518-522.

2) **ABDEL HASSAN, I., ABDEL-BARRY, J.A. & MOHAMMEDA, S.T., 2000.** The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology* **71,** 325-330.

3) **ADEBANJO, A. & BANKOLE, S.A., 2003.** Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. *African Journal of Biotechnology* **2(9),** 254-263.

4) **ADEBAYO-TAYO, B.C., ADEGOKE, A.A., OKOH, A.I. & AJIBESIN, K.K., 2010.** Rationalizing some medicinal plants used in treatment of skin diseases. *African Journal of Microbiology Research* **4(10),** 958-963.

5) **AFNOR., 1986.** Céréales et produit céréaliers. Recueil de normes françaises, 2emeEd, Lavoisier TEC & DOC, Paris, pp. 250-263p.

6) **AGUILLAR, F., HUSSAIN, S.P. & CERUTTI, P., 1993.** Aflatoxin B1 induces the tranversion of G--T in codon 249 of the p53 tumour suppresser in human hepatocyte. *Proc Nat Acad Sci* **90,** 8586- 8590.

7) **AKINSANMI, O.A., MITTER, V., SIMPFENDORFER, S., BACKHOUSE, D. & CHAKRABORTY, S., 2004.** Idendity and pathologenicity of *Fusarium spp* isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. *Australian Journal of Agricultural Research* **55,** 97-107.

8) **AL-GHAITHI, F., EL-RIDI, M.R., ADEGHATE, E. & AMIRI, M.H., 2004.** Biochemical effects of *Citrullus colocynthis* in normal and diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* **30,** 1-7.

9) **ALI, M.A. & PANDEY, A.K., 2007.** Cucurbitaceae of Bihar: diversity and conservation. Global Biodiversity Status and Conservation. Trivedi Editor, Pointer Publisher, Jaipur, Rajasthan, India, pp. 257–263.

10) **ALAIS, C. & LINDEN, G., 1997.** Biochimie Alimentaire. 4emeEd, Masson, Paris, pp. 248p.

11) AMBI, A.A., ABDURRAHMAN, E.M., SULE, M.I., PATEH, U.U., ABDURRAHMAN, Y.R. & IBRAHIM, N.D.G., 2007. Phytochemical screening and histopathological studies on the seeds of *Citrullus colocynthis* in albino rats. *Nig. Journ. Pharm. Sci* **6(2),** 7-13

12) AMROUCHE, A., 2007. Étude mycologique et mycotoxicologiques du blé tendre local et importé et ses dérivés de meunerie (farines et sons) stockés dans la région de Bechar. Extraction et détection des aflatoxines par méthode chromatographique. Thèse de magistère en biologie, Université de Bechar, Algérie.

13) AQUINO, O., MANSILLA, J.P. & MARIA, J.S., 2006. *In vitro* selection of an effective fungicide againstArmillaria mellea and control of white root rot of grapevine in the field. *Pest Manage Sci* **62,** 223-228.

14) ARORA, R.G., FROLEN, H. & NILSSON, A., 1981. Interference of mycotoxins with prenatal development of the mouse. *Acta Vet Scand* **22,** 638-641.

15) ATALLA, M.M., MOHAMED-HASSANEIN, N., ATEF-ELBEIH, A. & YOYSSEF, A. (2003). Mycotoxin production in wheat grains by different *Aspergillus* in relation to different relative humidity and storage periods. *Food Nahrung* **47,** 6-10.

16) ATANDA, O.O., AKPAN, I. & OLUWAFEMI, F., 2007. The potential of some spice essential oils in the control of A. parasiticus CFR 223 and aflatoxin production. *Food Control* **18,** 601-607.

B

17) BAHORUN, T., 1997. Substances naturelles actives: la flore mauricienne, une source d'approvisionnement potentielle. *Food and agricultural research council* **2**, 83-93.

18) BAJPAI, V., SHUKLA, S. & KANG, S., 2008. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of *Silene armeria L*. *Bioresour Technol* **99,** 8903-8908.

19) BANSO, A. & ADEYEMO, S.O., 2007. Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from Dichrostachys cinerea. *African Journal of Biotechnology* **6,** 1785-1787.

20) BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B., 1972. Illustrated genera of Imperfect fungi. 3thEd, Burgess publishing company, Minnesota, pp. 62- 197.

21) BATANOUNY, K.H., ABOU TABL, S., SHABANA, M. & SOLIMAN, F., 1999. Wild medicinal plants in Egypt: An Inventory to Support Conservation and Sustainable Use. Academy of Scientific Research and Technology, Egypt International Union for Conservation (IUCN), pp. 43.

22) BAUER, J. & GAREIS, M., 1987. Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *Journal of Veterinary Medicine* **34,** 613p.

23) BEKHECHI-BENHABIB, C., 2001. Analyse d'huile essentielle *d'Ammoïdes verticillata (Nûnkha*) de la région de Tlemcen et étude de son pouvoir antimicrobien. Thèse de magister de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen. Algérie.

24) BELLI, N., MARIN, S., SANCHIS, V. & RAMOS, A.J., 2004. Influence of water activity and temperature on growth of isolates of *Aspergillus* section Nigri obtained from grapes. *International Journal of Food Microbiology* **96,** 19-27.

25) BENDJEDDOU, D., LALAOUI, K. & SATTA, D., 2003. Immunostimulating activity of the hot water soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galangal* and *Citrullus colocynthis*. *Journal of Ethnopharmacol* **88,** 155-160.

26) BENMANSOUR-BRIXI, G.N., 2005- Étude microbiologique et mycotoxicologique des blés stockés dans la région de Tlemcen et l'influence des facteurs physiques sur l'aflatoxinogénese. Thèse de magister de biologie, Université de Djillali liabes de Sidi Bel Abbés, Algérie.

27) BENMEHDI, H., 2000. Valorisation de certaines plantes médicinales à activité hypoglycémiantes comme la coloquinte. Mémoire de magistère en chimie organique appliquée. Université de Tlemcen. Algérie.

28) BERTHIER, J. & VALLA, G., 1998. Moisissures - Mycotoxines et Aliments : du Risque à la Prévention. Université Claude Bernard, Lyon, pp. 05-20.

29) BHATNAGAR, D. & MCCORMICK, S.P., 1988. The inhibitory effect of neem (Azadirachta indica) leaf extracts on aflatoxin synthesis in Aspergillus parasiticus. *Journal of the American Oil Chemical Society* **65,** 1166–1168.

30) BILGRAMI, K.S. & SINHA, K.K., 1992. Aflatoxins: their biological effects and ecological significance. *Handbook of Applied Mycology* **5,** 5-86.

31) BILLERBECK, V.G., ROQUES, C., VANIÈRE, P. & MARQUIER, P., 2002. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. *Hygienes* **3(10),** 248-251.

32) BNOUHAM, M., ZIYYAT, A., MEKHFI, H., TAHRI, A. & LEGSSYER, A., 2006. Medicinal plants with potential antidiabetic activity - A review of ten years of herbal medicine research (1990-2000). *International Journal of Diabetes and Metabolism* **14,** 1-25.

33) BOTTON, B., BRETON, A., FEVRE, M., GAUTHIER, S., GUY, P.H., LARPENT, J.P., REYMOND, P., SANGLIER, J.J., VAYSSIER, Y. & VEAU, P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. 2emeEd, Masson, Paris, pp. 442.

34) BOUDRA, H., LE BARS, P. & LE BARS, J., 1995. Thermostability of ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environnmental Microbiology* **61,** 1156-1158.

35) BOUKEF, K. & SOUISSI, H.R., 1982. Contribution à l'étude des plantes médicinales en médecine populaire en Tunisie. *Rev. Soc. Pharm* **3,** 34- 35**.**

36) BOURGEOIS, C.M., MESCLE, J.F. & ZUCCA, J., 1996. Microbiologie Alimentaire. Tome1 : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. Technique & doc Lavoisier, Paris, pp. 672.

37) BRANTNER, A., MALES, A., PEPELJAK, S. & ANTOLIC, A., 1996. Antibacterial activity of aliurus spina-Christ Mill (Christis thorn). *Journal of. Ethnopharmacol* **52,** 119-122.

38) BRUNETON, J., 1996. Plante toxique : Végétaux dangereux pour l'homme et les animaux. Tec & Doc Lavoisier, Paris, pp. 529.

39) BRUNETON, J., 1999. Pharmacognosie, Phytochimie, plantes médicinales. 3eme Ed, Tec &Doc Lavoisier, Paris, pp.1120.

C

40) CASTEGNARO, M., BAREK, J., FRÉMY, J.M., LAFONTAINE, M., MIRAGLIA, M., SANSONE, E.B. & TELLING, G.M., 1991. Laboratory Decontamination and Destruction of Carcinogens in Laboratory Wastes: some Mycotoxins. IARC Scientific Publications N°:113, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 63.

41) CHABASSE, D., 2002. Les moisissures d'intérêt médical. Cahier N°25 de formation de biologie médicale, pp. 25-27.

42) 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. *Bioresource Technology* **99,** 6266-6270.

43) CHAWLA, K., 1984. Management of Cereal Grain in Storage. AGRI – FACTS, Practical Information for Alberta's Agriculture Industry, Agdex.

44) CHEFTEL, J.C & CHEFTEL, H., 1977. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, pp. 105-130.

45) COLE, R.J. & COX, R.H., 1981. Handbook of Toxic Fungal Metabolites. Academic Press, New York, pp. 1-66.

46) COLE, R.J., JARVIS, B.B. & SCHWEIKERT, M.A., 2003. Handbook of secondary fungal metabolites. *Academic Press (USA)* **3,** 615-624.

47) COTTY, P.J. & BHATNAGAR., 1994. Variability among atoxigenic *Aspergillus flavus* strains to prevent aflatoxin contamination and production of aflatoxin biosynthetic pathway enzyme. *Applied and Environmental Microbiology* **60,** 2248-2251.

48) CREPPY, E.E., BETBEDER, A.M., GHARBI, A., COUNORD, J., CASTEGNARO, M., BARTSCH, H., MONCHARMONT, P., FOUILLET, B., CHAMBON, P. & DIRHEIMER, G., 1991. Human ochratoxicosis in France. In : Castegnaro M., Plestina R., Dirheimer G., Chernozemsky I.N. & Bartsch H., eds, Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours, IARC Scientific Publ. No 115, Lyon. 145-151.

49) CRISTANI, M., D'ARRIGO, M., MANDALARI, G., CASTELLI, F., SARPIETRO, M.G. & MICIELI, D., 2007. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with modal membranes: Implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55,** 6300-6308.

50) CURTUI, V., USLEBER, E., DIETRICH, R., LEPSCHY, J. & MARTLBAUER, E., 1998, A survey of the occurrence of mycotoxins in wheat and maize from western Romania. *Mycopathol* **143,** 97-103.

D

51) DARWISH-SAYED, M., BALBAA, S.I. & AFIFI, M.S.A., 1973. Nitrogenous base of the different organs of *Citrullus colocynthis*. *Planta Medica* **24(3),** 260-265.

52) DAVIS, N.D. & DIENER, U.L., 1987 Mycotoxins, in: Food and Beverage Mycology, 2nd Ed, Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 517-570.

53) DERACHE, R., 1986. Toxicologie et sécurité des aliments. Technique et documentation Lavoisier, Paris, pp. 105-126.

54) DERBEL, S. & GHEDIRA, K., 2005. Les phytonutriments et leur impact sur la santé. *Phytothérapie et nutrition* **03(01),** 28-34.

55) 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, pp. 1-22.

56) DRUVEFORS, U.Ä., 2004. Yeast Biocontrol of Grain Spoilage Moulds Mode of Action of Pichia anomala. Doctoral thesis. University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden. Agraria 44-466.

57) DUKE, J.A., 1978. The quest for tolerant germplasm. ASA Special Symposium 32, Crop tolerance to suboptimal land conditions. Am. Soc. Agron. Madison, WI: 1-61.

58) DUKE, J.A., 1983. *Citrullus colocynthis (L.) Schrad*. Handbook of Energy Crops.

59) DUNOYER, C., 1989. Principes de la microbiologie en industries céréalière, Industries des céréales, pp. 13-16.

60) DURON, B.S., 1999. Le Transport Maritime des Céréales. Mémoire de D.E.S.S. Université d'Aix-Marseille, pp 81.

E

61) ELAD, Y., 1991. Multiple resistance to benzimidazoles dicarboximides and diethofencarb in field isolates of Bobytis cinerea in Israel. *Plant Pathol* **41,** 41-46.

62) ELLING, F., NELSEN, J.P., LILLEHOJ, E.B., THOMASSEN, M.S. & STORMER, F.C., 1985. Ochratoxin A - induced porcine nephropathy: enzyme and ultrastructural changes after short-term exposure. *Toxicon* **23,** 247-254.

63) ENCARTA ., 1998. Digital multimedia encyclopedia published by Microsoft Corporation.

64) ESKOLA, M., 2002. Study on trichothecenes,Zearalenone and Ochratoxin A in finnish Cereals : Occurrence and Analytical Techniques. Academic dissertation.

65) ESTEBEN, A., ABARCA, M.L., BRAGULAT, M.R. & CABANES, F.J., 2004- Effects of temperature and incubation time on production of ochratoxin A by black *aspergillus*. *Research in Microbiology* **155,** 861-866.

F

66) FARAG, R.S., DAW, Z.Y., HEWEDI, F.M. & EL-BAROTY, G.S.A., 1989. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J. Food Protect* **52,** 665–667.

67) FIELD, B., JORDEN, F. & OSBOUM, A., 2006. First encounters-deployment of defense-related natural products by plants. *New Phytol* **172,** 193-207.

68) FILTENBORG, O., FRISVAD, J.C. & THRANE, U., 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology* **33,** 85-102.

69) FOGLIANI, B., RAHARIVELOMANANA, P., BIANCHINI, J.P., BOURAIMA-MADJEBI, S. & HNAWIA, E., 2005. Bioactive ellagitannins from Cunonia macrophylla, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia. *Phytochemistry* **66,** 241–247

70) FREMY, J.M., 1982. Aflatoxines et produits laitiers. *Bull Lab Vét* **6,** 57-64.

G

71) GARNERO, J., 1991. Les huiles essentielles, leur obtention, leur composition, leur analyse et leur normalisation. Encyclopédie des médecines naturelles, phytothérapie, Aromathérapie, Paris, pp. 2-20.

72) GEBHARDT, R., 2003. Antioxidative, antiproliferative and biochemical effects in Hep G2 cells of a homeopathic remedy and its constituent plant tinctures tested separately or in combination. *Arzneimittelforschung* **53,** 823-830.

73) GHORBANIAN, M., RAZZAGHI-ABYANEH, M., ALLAMEH, A., SHAMS-GHAHFAROKHI, M. & QORBANI, M., 2008. Study on the effect of neem *(Azadirachta indica A. Juss)* leaf extract on the growth of *Aspergillus parasiticus* and production of aflatoxin by it at different incubation times. *Mycoses* **51(1),** 35–39.

74) GODON, B. & LOISEL, W., 1997. Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales. 2eme Ed, Tech & Doc Lavoisier, Paris, pp. 819.

75) GODON, B., 1991. Biotransformation des produits céréaliers. Technique & documentation Lavoisier, Paris, pp. 221.

76) GRAVEN, E.H., DEANS, S.G., SVOBODA, K.P., MARI, S., & GUNDIDZA, M.G., 1992. Antimicrobial and antioxidative properties of the volatile (essential) oil of Artemisia afra Jacq. *Flavour Fragrance J* **7,** 121-123.

77) GURUDEEBAN, S., RAJAMANICKAM, E., RAMANATHAN, T. & SATYAVANI, K., 2010. Antimicrobial activity of *citrullus colocynthis* in gulf of mannar. *International Journal of Current Research* **2,** 078-081.

H

78) HADIZADEH, F., EBRAHIMZADEH, M.A., HOSSEINZADEH, H., MOTAMED-SHARIATY, V., SALAMI, S. & BEKHRADNIA, A.R., 2009. Antidepressant and antioxidant activities of some 2-benzoxazolinone derivatives as bupropion analogues. *Pharmacologyonline* **1,** 331-335.

79) HARIS, C., 1989. Introduction to modern microbiology. blackwell scientific publication, pp. 179.

80) HENNEBELLE, T., SAHPAZ, S. & BAILLEUL, F., 2004. Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie* **1,** 3-6.

81) HENNING, A., FINK-GREMMELS, J. & LEISTNER, L., 1991. Mutagenicity and effects of ochratoxin A on the frequency of sister chromatid exchange after metabolic activation. In Mycotoxins, Endemic Nephropathy and Urinary Tract Tumours (M. Castegnaro, R. Plestina, G. Dirheimer, I. N. Chernozemsky, and H. Bartsch, Eds.). IARC Scientific Publications, Vol. 115, 255–260. International Agency for Research on Cancer, (Lyon).

82) HUA, S.S.T., GROSJEAN, O.K. & BAKER, J.L., 1999. Inhibition of aflatoxin biosynthesis by phenolic compounds. *Lett Appl Microbiol* **29,** 289–291.

83) HUFF, W.E., KUBENA, L.R. & HARVEY, R.B., 1992. Progression of ochratoxicosis in broiler chickens. *Poultry Science* **71,** 64-69.

I

84) IARC., 1993. Ochratoxin A. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: some naturally occurring substances; food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. *International Agency for Research on Cancer* **56,** 26-32.

85) IROBI, O.N. & DARANOLA, S.O., 1994. Bactericidal propenies of crude extracts of racarpu villosus. *J Ethnophannacol* **42,** 39-43.

86) ISEBAERT, S., HAESAERT, G., DEVREESE, R., MAENE, P., FREMAUT, F. & VLAEMYNCK, G., 2005, *Fusarium spp* and *Fusarium mycotoxins* in maize: a problem for Flanders. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci* **70,** 129-136.

87) ISERIN, P., MASSON, M. & RESTELLINI, J.P., 1997. Encyclopédie des plantes médicinales. Larousse-Bordas, pp. 336.

J

88) JAKAB, G.J., HMIELSKI, R.R., ZARBA, A., HEMENWAY, D.R. & GROOPMAN, J.D., 1994. Respiratory aflatoxicosis : suppression of pulmonary and systemic host defenses in rats and mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* **125,** 198-205.

89) JAQUET, J., LAFONT, J. & LAFONT, P., 1982. Sur la contamination du lait par les aflatoxines. *Revue laitière française* **42,** 63-67

90) JOUANY, J. P. & YIANNIKOURIS, A., 2002. Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA Productions Animales* **15** (**1**), 3-16.

K

91) KARUMI, Y., ONYEYILI, P.A. & OGUGBUAJA, V.O., 2004. Identification of active principals of *M. balsamina* (Balsam apple) leaf extract. *J Med Sci* **4,** 179-182.

92) KESSLER, M., UBEAUD, G. & JUNG, L., 2003. Anti-and prooxidant activity of rutin and quercetin derivatives. *J Pharm and Pharmacol* **55,** 131.

93) KOFFI, N., BEUGRÉ, K., GUÉDÉ, N., 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.

94) KRYSINSKA-TRACZYK, E., PERKOWSKI, J. & DUTKIEWICZ, J., 2007, Levels of fungi and mycotoxins in the samples of grain and grain dust collected from five various cereal crops in eastern Poland. *Ann. Agric. Environ. Med* **14,** 159-167.

95) KUMAGAI, S., BINTVIHOK, A., KONO, M., IWAKI, M., SUGITA-KONISHI, Y., ITO, Y. & KATO, M., 1995. *In vitro* aflatoxin B1-DNA binding by microsomes and its modulation by cytosol : comparison of various mammalian and avian livers in relation to species differences in susceptibility. *J. Food Hyg. Soc. Japan* **36,** 365-374.

96) KURTZMAN, C.D., HORN, B.W. & HESSELTINE, C.W., 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii. Antonie van Leeuwenhoek* **53,** 174- 158.

L

97) LANSBOROUGH, L.A., 2004. Food microbiology laboratory. Published by CRC press, pp. 179.

98) LARPENT, J.P., 1990. Moisissures Utiles et Nuisibles Importance Industrielle. 2emeEd, Masson, Paris, pp. 512.

99) LASS-FLÖRL, C., PERKHOFER, S. & MAYR, A., 2010. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* **53,** 1-11.

100) LE BARS, J. & LE BARS, P., 1987. Les moisissures des denrées alimentaires et leurs conséquences. Conférences prononcées dans le cadre de la réunion de la "Section Midi-Pyrénées" à Toulouse, le 18 septembre 1987, (cf. Bulletin de l'Association des Anciens élèves de l' Institut Pasteur, 4e trimestre 1987).

101) LEE, H.S., 2007. Fungicidal property of active component derived from Acorus gramineus rhizome against phytopathogenic fungi. *Bioresour. Technol* **98,** 1324-1328.

102) LEE, K.W., KIM, Y.J., LEE, H.J. & LEE, C.Y., 2003. Cocoa Has More Phenolic Phytochemicals and a Higher Antioxidant Capacity than Teas and Red Wine. *J. Agric. Food Chem* **51,** 7292-7295.

103) LEE, S.E., PARK, B.S., BAYMAN, P., BAKER, J.L., CHOI, W.S., & CAMPBELL, B.C., 2007. Suppression of ochratoxin biosynthesis by naturally occurring alkaloids. *Food Additives and Contaminants* **24,** 391–397.

104) LEMKE, P.A., DAVIS, N.D,. IYER, S.K., CREECH, G.W. & DIENER, U.L., 1988. Fluor metric analysis of iodinated aflatoxin in minicultures of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Indust. Microbiol* **3,** 119-125.

105) LEMKE, P.A., DAVIS, N.D. & CREECHGREGORY, W., 1989. Direct Visual Detection of Aflatoxin Synthesis by Minicolonies of *Aspergillus* Species, applied and environmental microbiology. *American Society for Microbiology* **55(7),** 1808-1810.

106) LEYRAL, G. & VIERLING, E., 2001. Microbiologie et Toxicologie des aliments. 3ème Ed, Lavoisier, Paris, France, pp. 16-94.

107) LINDEN, G. & LORIENT, D., 1994. Biochimie agro-industrielle. Masson. Paris. 360 p.

108) LINUMA, M., TSUCHIYA, H., SATO, M., YOKOYAMA, J., OHYAMA, M., OHKAWA, Y., TANAKA., FUJIWARA, S. & FUJII, T., 1994. Flavanones with potent antibacterial activity against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *J. Pharmacol* **46(11),** 892-895.

109) LUND, F. & FRISVAD, J.C., 2003. Penicillium verrucosum in cereals indicates production of ochratoxin A. *Journal of Applied Microbiology* **95,** 1117-1123.

M

110) MAATOOQ, G.T., EL-SHARKAWY, S.H., AFIFI, M.S. & ROSAZZA, P.N., 1997. C-p- Hydroxybenzoylglyco-flavones from *Citrullus colocynthis*. *Phytochemistry* **44(1),** 187.

111) MAGAN, N. & HOPE, C.V. & ALDRED, D., 2003. Post – harvest fungal ecology : Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology* **109,** 723-730.

112) MAGAN, N. & LACEY, J., 1988. Ecological determination of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology Elsevier* **7(3),** 245- 256.

113) **MALEC, L.S. & PAMILIO, A.B., 2003.** Herbivory effects on the chemical constituents of *Bromus pictus*. *Molecular Medicinal Chemistry* **1,** 30-38.

114) MARZOUK, B., MARZOUK, Z., DÉCOR, R., EDZIRI, H., HALOUI, E., FENINA, N. & AOUNI, M., 2009. Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. *J. Ethnopharmacol* **125,** 344-349.

115) MARZOUK, B., MARZOUK, Z., HALOUI, E., FENINA, N., BOURAOUI, A. & AOUNI, M., 2010. Screening of analgesic and anti-inflammatory activities of *Citrullus colocynthis* from southern Tunisia. *J. Ethnopharmacol* **128,** 15-19.

116) MARZOUK, B., MARZOUK, Z., MASTOURI, M., FENINA, N. & MAHJOUB, A., 2011. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of *Citrullus colocynthis* immature fruit and seed organic extracts. *African Journal of Biotechnology* **10(10),** 2130-2134.

117) MILLER, J.D. & TRENHOLM, H.L., 1994. Myctoxins in Grain: Compounds other than Aflatoxins. Eagan Press, St Paul MN.

118) MILLER, J.D., 2002. Aspects of the ecology of Fusarium toxins in cereals. *Adv. Exp. Med. Biol* **504,** 19-27.

119) MILLS, J.T., 1990. Mycotoxins and fungi on cereal grains in western Canada. *Can. J. Physiol. Pharmacol* **68,** 982-986.

120) MIRETE, S., PATINO, B., VAZQUEZ, C., JIMENEZ, M., HINOJO, M.J., SOLDEVILLA, C. & GONZALEZ-JAEN, M.T., 2004. Fumonisin production by Gibberella fujikuroi strains from Pinus species. *International Journal of Food Microbiology* **89,** 213–221.

121) MOJAB, F., KAMALINEJAB, M., GHADERI, N. & VAHIDIPOUR, H.R., 2003. Phytochemical screening of some species of Iranian plants. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research,* 77-82.

122) MOLINIÉ, A., FAUCET, V., CASTEGNARO, M. & PFOHL-LESZKOWICZ, A., 2005. Analysis of some breakfast cereals collected on the French market for their content in OTA, Citrinin and Fumonisin B1. Development of a new method for simultaneous extraction of OTA and Citrinin. *Food chemistry* **92,** 391-400.

123) MOLL, M. & MOLL, N., 1995. Sécurité Alimentaire du consommateur. Chapitre 3 : les mycotoxines : des contaminants omniprésents dans l'alimentation humaine et animale, risque et prevention, pp. 300.

124) MSHVILDADZE, V., FAVEL, A., DELMAS, F., ELIAS, R., FAURE, R. & DECANOSIDZE, Q., 2000. Antifungal and antiprotozoal activities of saponins from *Hedera colchica. Pharmazie* **55,** 325–326.

125) MÜLLER, H.M., 1982. Decontamination of Mycotoxin. *I. Physical process. Ubersicht Tierernähr* **10,** 95-122.

126) MULTON, J.L., 1982. Conservatione et Stockage Des Grains et Graines et Produits Derivés- Céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. Technique & Documentation Lavoisier, Paris, pp. 576.

N

127) NAJAFI, S., SANADGOL, N., SADEGHI, N.B., ASHOFTEH, M.B. & SANADGOL, E., 2010. Phytochemical screening and antibacterial activity of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Plants Research* **4(22),** 2321-2325.

128) NEWBERNE, P.M. & BUTLER, W.H., 1969. Acute and chronic effects of aflatoxin on the liver of domestic and laboratory animals. *A review. Cancer Research* **236,** 29-33.

O

129) OEPP., 2003. protocoles de diagnostic pour les organismes réglementés. *Normes OEPP Bulletin* **33,** 245–247.

130) OJALA, T., REMES, S., HAANSUU, P., VUORELA, H., HILTUNEN, R., HAAHTELA, K. & VUORELA, P., 2000. Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J. Ethnophannacol* **73,** 299-305.

131) OLOYEDE, O.I., 2005. Chemical profile of Unripe Pulp of *Carica papaya*, *Pakistan journal of nutrition* **4,** 379-381.

132) OLSSON, J., 2000. Modern Methods in Cereal Grain Mycology. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Agraria, pp. 37-241.

133) OMIDBEYGI, M., BARZEGAR, M., HAMIDI, Z. & 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.

P

134) PARIS, R. & MOYSE, M., 1965. Précis de matière médicale. Masson, Paris, pp. 412.

135) PETERSON, J.D.M., 1998. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutrition Res* **18,** 1995-2018.

136) PFOHL-LESZKOWICZ, A., 1999. Les mycotoxines dans l'alimentation, Évaluation et gestion du risque. Lavoisier, Paris, pp. 478.

137) PIER, A.C., RICHARD, J.L. & CYSEWSKI, S.J., 1980. The implications of mycotoxins in animal disease. *J. Am. Vet. Med. Assoc* **176,** 719-725.

138) PIETRI, A., BERTUZZI, T., PALLARONI, L., & PIVA, G., 2004. Occurrence of mycotoxins and ergosterol in maize harvested over 5 years in northern Italy. *Food Addit. Contam* **21,** 479-487.

139) 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.

140) PRABAVATHY, V.R., MATHIVANAN, N., SAGADEVAN, E., MURUGESAN, K. & LALITHAKUMAN, D., 2006. Self-fusion of protoplasts enhances chitinase production and biocontrol activity in *Trichoiderma harzianum*. *Bioresour. Technol* **97,** 2330-2334.

R

141) RAMIREZ, C., 1982. Manual and atlas of the *Penicillium*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

142) REED, C., 1992. Development of storage techniques: A historical perspective. In Storage of Cereal Grains and Their Products. Edited by D. B, Sauer, St Paul, pp. 143-156.

143) RIBA, A., SABAOU, N., MATHIEU, F. & LEBRIHI, A., 2005. Premières investigations sur les champignons producteurs d'Ochratoxine A dans la filière céréale en Algérie. Symposium Euro-Maghrébin sur les contaminants biologiques chimiques et la sécurité alimentaire, Fès.

144) RIBELIN, W.E., FUKUSHIMA, K. & STILL, P.E., 1978. The toxicity of ochratoxin A to ruminants. *Can. J. Comp. Med* **42,** 172-176.

145) RICHARD, J.L., 1998. Mycotoxins, Toxicity and Metabolism in Animals. A system Approach Overview. Mycotoxins and Phycotoxins-Developpements in Chemistry, *Toxicology and Food Safety,* 363- 397.

146) ROY, R.K., THAKUR, M. & DIXIT, V.K., 2007. Development and evaluation of polyherbal formulation for hair growth-promoting activity. *J. Cosmet. Dermatol* **6,** 108-112.

S

147) SADIPO, O.A., AKANJI, M.A., KOLAWOLE, F.B. & ODUTUGA, A.A., 1991. Saponin is the active antifungal principle in Garcinia Kola, heckle seed, *Biosci. Res. Commun* **3,** 171.

148) SAMSON, R.A., HOUBRAKEN, J.Q.M.P., KUIJPERS, A.F.A., FRANK, J.M. & FRISVAD, J.C., 2004. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section Nigri. *Studies in Mycology* **50,** 45-61.

149) SAWAYA, W.N., DAGHIR, N.J. & KHALIL, J.K., 1986. *Citrullus colocynthis* seeds as a potential source of protein for food and feed. *Journal-of Agricultural and Food Chemistry* **34(2),** 285-88.

150) SCALBERT, A., 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* **30,** 3875–3883.

151) SCHOLLENBERGER, M., MULLER, H.M., RUFLE, M., SUCHY, S., PLANK, S. & DROCHNER, W., 2006, Natural occuence of 16 Fusarium toxins in grains and feedstuffs of plant origin from Germany, *Mycopathologia* **161 (1),** 43-52.

152) SEGER, C.H., STRUM, S., MAIR, M.E., ELLMERER, E.P. & STUPPNER, H., 2005. ^{1}H and ^{13}CNMR signal assignment of cucurbitacin derivatives from *Citrullus colocynthis* (L) Scharder and *Ecballuim elaterium* L. (Cucurbitaceae). *Magn. Reson. Chem* **43,** 489-491.

153) SENHAJI, O., FAID, M., ELYACHIOUI, M. & DEHHAOUI, M., 2005. Étude de l'activité antifongique de divers extraits de la cannelle. *Journal de Mycologie Médicale* **15,** 220-229.

154) SHENG-HSIEN, L., KU-SHANG, C., MIN-SHENG, S., YUNG-SHENG, H. & HANG-DER, J., 2007. Effect of some Chinese medicinal plant extracts on five different fungi. *food contro* **18,** 1547-1554.

155) SIDHU, O.P., HARISH, C.H.M. & BEHL, A., 2009. Occurrence of aflatoxins in mahua (Madhuca indica Gmel.) seeds: Synergistic effect of plant extracts on inhibition of *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin production. *Food and Chemical Toxicology* **47,** 774-777.

156) SIKKEMA, J., DE BONT, J.A.M. & POOLMAN, B., 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **59,** 201-222.

157) SINCICH, F., 2002. Bedouin Traditional Medicine in the Syrian Steppe. Rome, FAO, pp. 114-115.

158) STEYN, P.S., 1980, The biosynthesis of mycotoxins: a study of secondary metabolism. *Acadelic Press, INC.*

159) STEYN, P.S., 1998. The biosynthesis of mycotoxins. *Rev Med Vet* **149(6),** 469-478.

160) SUTRA, L., FREDERICH, M. & JOUVE, J.L., 1998. Manuel de Bactériologie Alimentaire**.** Polytechnica, Paris, pp.15-20.

T

161) TAHANI, N., ELAMRANI, A., SERGHINI-CAID, H., OUZOULINE, M. & KHALID, A., 2008. Isolement et Identification de souches de moisissures réputées toxinogènes. *Rev. Microbiol. Ind. San et Environn* **02(01),** 81-91.

162) TANTAOUI, E.A., 1977. Production d'aflatoxine par des Aspergillus du Maroc. *Homme. Terre et Eaux* **6(24),** 79- 86.

163) THANABORIPAT, D., NONTABENJAWAN, K., LEESIN, K., TEERAPIANNONT, D., SUKCHAREON, O. & RUANGRATTANAMATEE, V., 1997. Inhibitory effects of garlic, clove and carrot on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. *Journal of Forestry Research* **8,** 39–42.

164) TRIPATI, P. & DUBEY, N.K., 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biol. Technol* **32,** 235–245.

165) TRIVEDI, A.B., DOI, E. & KITABATAKE, N., 1992. Detoxification of Ochratoxin A on Heating under Acidic and Alkaline Conditions. *Biosci. Biotech. Biochem* **56(5),** 741-745.

U

166) UGRINOVITS, M. & ZUCKERANALYSEN., 2002. Mit GC, HPLC, DC und enzymatisch; ein Vergleich der Methoden. *Chromatographia* **13,** 386 - 394.

V

167) VAN DER MERVE, K.J., STEYN, P.S., FOURIE, L., SCOTT, D.B. & THERON, J.J., 1965. Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Wilh. Nture* **205,** 1112-1113.

168) VELDHUIZEN, E., TJEERDSMA-VAN BOKHOVEN, C., ZWEIJTZER, S.A., BURT. & HAAGSMAN, H.P., 2006. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. *J. Agric. Food Chem* **54,** 1874-1879.

W

169) WANG, S.Y., CHEN, P.F. & CHANG, S.T., 2005. Antifungal activities of essential oils and their constituents from indegenous cinnamon (*Cinnamomum osmophleoum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology* **96,** 813- 818.

170) WEINDENBÖRNER., 2000. Whole wheat and white wheat flour; the mycobiota and potential mycotoxins. *Food Microbiology* **17,** 103-107.

171) WILD, C.P., GARNER, R.C., MONTESANO, R. & TURSI, F., 1986. Aflatoxin B1 binding to plasma albumin and liver DNA upon chronic administration to rats. *Carcinogenesis* **6,** 853-858.

172) WILSON, D.M., MUBATANHEMA, W. & JURJEVIC, Z., 2002. Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Adv. Exp. Med. Biol* **504,** 3-17.

173) WITHLOW, L.W. & HAGLER, W.M., 2001. Mycotoxin contamination of feedstuffs-An additional stress factor for dairy cattle. North Carolina State University, Raleigh, NC. Symposium sur les bovins laitiers. CRAAQ Québec.

Y

174) YAGOUB, S.O., 2008. Anti-Microbial Activity of *Tamarindus indica* and Adansonia digitata extracts against *E. coli* Isolated from Urine and Water Specimens. *Res. J. Microbiol* **3,** 193-197.

175) YAN, D., JIN, C., XIAO, X.H., & DONG, X.P., 2008. Antimicrobial properties of berberines alkaloids in Franch Coptis chinensis by microcalorimetry, *J Biochem Biophys Methods* **70,** 845–849;

Z

176) ZAKARIA, Z. & MAJERUS, P., 1992. A rapid, sensitive and economic method for the detection, quantification and confirmation of aflatoxins. *Zeitschrift fur Lebensmitte Untersuchung und-Forshung Spring-Verlag* **195(4),** 316-319.

177) ZEE-CHENG, R.K., 1997. Anticancer research on Loranthaceae plants. *Drugs Future* **22(5),** 515-530.

178) ZIA-UR-RAHMAN., 2006. Storage effect on nutritional quality of commonly consumed cereals. *Food Chemistry* **95,** 53-57

179) ZIYYAT, A., LEGSSYER, A., MEKHFI, H., DASSOULI., SERHROUCHNI, M. & BENJELLOUN, W., 1997. Phytotherapy of hypertension and diabetes in oriental Morocco. *Journal of Ethnopharmacology* **58,** 45-54.

180) ZORO, A.B.I., KOFFI, K.K. & 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.

181) ZUBER, Y.M.H., LILLEHOJ, E.B. & RENFRO, B.L., 1987. Aflatoxine in maize : A proceedings of the workshop. Published by CIMMYT,Mexico, pp. 389.

Annexe.

I. Composition des milieux de culture

Milieu PDA (Potatoes Dextrose agar)

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200 g
Dextrose	10 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu CDA (Czapek Dox Agar)

Sucrose	30 g
KH2PO4	1 g
KCL	0.5 g
MgSO4	0.5 g
FeSO4	0.01 g
NaNO3	3 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

(Czapek Concentre)

NaNO3	30 g
KCL	5 g
MgSO4	5 g
FeSO4	0.1 g
Eau distillée	100 ml

Milieu MEA (Malt Extract Agar)

Matière Sèche	50 g
Agar	5 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu YES (Yeast Extract Sucrose)

Sucrose	40 g
Extrait de Levure	20 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu CYA (Czapek Yeast Agar)

Czapek Concentre	10 ml
KH2PO4	1 g
Extrait de levure	5 g
Sucrose	30 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu G25N (25 % Glycérol Nitrate Agar)

KH2PO4	0.75 g
Czapek Concentre	7.5 ml
Extrait de levure	3.7 g
glycerol	250 g
Agar	12 g
Eau distillée	750 ml

Milieu AFPA (Milieu Selectif pour A.flavus et A.parasiticus)

Extrait de levure	20 g
peptone	10 g
Citrate ferrique ammoniacal	0.5 g
chloramphenicol	0.1 g
Dichloran solution ethaolique à 0.2%	1 ml
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Eau physiologique

NaCl	9 g
Eau distillée	1000 ml

Lactophenol

Phénol pur cristallisé	20 g
Acide lactique	20 ml
Glycérol pur	20 ml
Eau distillée	40 ml

Rose Bengal

Rose bengal	1 g
Eau distillée	100 ml

Bleu de coton

Lactophénol bleu de méthylène	0,5 g

Coconut extract agar (CEA)

Cent grammes de la noix de coco déchiquetée ont été homogénéisés pendant 5 minutes avec 300 ml d'eau distillée chaude. La solution est filtrée à l'aide du tissu. L'agar a été ajouté (20 g/liter). Le mélange a été alors stérilisé à l'autoclave à 121°C/15 minutes. Le pH final est de 7,0.

II. Règlements des teneurs en mycotoxines dans les denrées alimentaires

Tableau 11. Valeurs recommandées par le Codex Alimentarius pour les échanges mondiaux de denrées alimentaires destinées à l'homme

Mycotoxines	Denrées	Teneurs maximales admissibles (µg/kg)
Aflatoxine B1	Alimentation infantile	1
Aflatoxine M1	Lait	0.5
Ochratoxine A	Céréales	5
Patuline	Pommes (jus et produits à base de)	50

Tableau 12. Règlements européens pour la limitation des teneurs en mycotoxines dans les denrées alimentaires destinées à l'homme (N° 466 du 8/03/2001, JOCE L77 ; N° 472 du 12/03/2002, JOCE L75 ; N° 257 du 12/02/2002, JOCE L41).

Mycotoxines	Denrées	Teneurs maximales admissibles (µg/kg)
Aflatoxine B1	• Arachides, fruits à coque et séchés, et produits dérivés	2
	• Arachides soumises à traitement physique avant consommation ou ingrédients	8
	• Fruits à coque et séchés soumis à traitement physique avant consommation ou ingrédients	5
	• Céréales et dérivés, consommation directe ou ingrédients	2
	• Céréales soumises à traitement physique avant consommation ou ingrédients	2
Aflatoxine B1	• Épices (poivre, piments, paprika, noix de muscade, gingembre, safran)	5
Aflatoxine M1	• Lait	0.05
Ochratoxine A	• Céréales (dont riz et sarrasin) et produits dérivés, grains bruts	5
	• Produits dérivés et grains à consommation directe	3
	• Raisins secs	10
Patuline	• Jus de fruits (pomme) et nectar de fruits	50
	• Boissons spiritueuses, cidres et boissons fermentées	50
	• Produits à base de morceaux de pomme (compote et purée)	25
	• Jus de pomme et produits à base de morceaux de pomme (compote et purée	10

Résumé :

Contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogéne des extraits méthanoliques et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur quelques souches fongiques isolées du blé tendre stocké.

Les extraits de plantes et leurs constituants ont une longue histoire comme agents antifongique. Cependant, leur utilisation comme préservateurs de blé tendre a été rarement rapportée. Ce travail porte sur l'étude *in vitro* de l'activité antifongique et antimycotoxinogéne des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* (L.) Schard, une plante aromatique et médicinale de la flore du Sahara algérien, vis-à-vis de quelques champignons pathogènes de contamination du blé tendre stocké.

L'étude de la qualité du blé tendre local et importé a montré que le taux de contamination de la variété importée est très élevé. Le genre *Aspergillus* représenté par des espèces différentes a été retrouvé dans les deux variétés analysées avec une fréquence et une abondance allant de 41 à plus de 86% de la flore totale identifiée sur milieu CDA et PDA. Les genres *Penicillium* et *Alternaria* sont peu fréquents. Enfin, Les genres *Cladosporium*, *Ulocladium* et *Fusarium* sont les moins abondants dans les deux variétés de blé tendre analysées. Parmi ces moisissures au moins deux espèces du genre *Aspergillus* sont potentiellement toxinogènes.

L'analyse phytochimique des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* a révélé la présence de quelques groupes chimiques (polyphénols totaux, stéroïdes et alcaloïdes) susceptibles d'exprimer les activités antifongiques recherchées. L'activité antifongique des extraits est testée par la méthode de micro-dilution en milieu solide afin de calculer l'indice antifongique. Les résultats suggèrent que l'extrait méthanolique a empêché totalement la croissance mycélienne d'*A. fumigatus* et *A. niger* avec une CMF de 2.5% (25mg/ml) et *A. ochraceus* avec une CMF de 0.5% (5 mg/ml) enregistrant un indice antifongique de 100%. A la même concentration 2.5% (25mg/ml) l'extrait aqueux a inhibé la croissance d'*A. ochraceus*. Les deux extraits possèdent un bon pouvoir antimycotoxinogéne. La synthèse d'AFB1 et d'OTA produites par *A. flavus* et *A. ochraceus* est bloquée en présence des extraits dans le milieu YES. Les résultats montrent que les extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* utilisés à faible concentration pourraient avoir un potentiel important pour le contrôle biologique des champignons dans les denrées alimentaires.

Mots clés : Blé tendre, *Citrullus colocynthis,* extrait aqueux, extrait méthanolique, analyse phytochimique, indice antifongique, pouvoir antimycotoxinogéne.

Abstract

Contribution to study of the antifungal and antimycotoxigenic activity of methanol and aqueous extract of seeds of *Citrullus colocynthis* against some fungi isolated from wheat stored.

Plant extracts and their constituents have a long history as antifungal agents. However, their use to preserve wheat has rarely been reported. This work is based on *in vitro* study of the antifungal and antimycotoxinogénic activity of methanol and aqueous extracts of the seeds of *Citrullus colocynthis* (L.) Schard, an aromatic and medicinal plant of the flora of the Algerian Sahara, against some pathogenic fungi contaminated the stored wheat.

The study of the quality of local and imported wheat has shown that the rate of contamination of the imported variety is very high. The genus *Aspergillus* represented by different species was found in two varieties which had been analyzed with a frequency and an abundance ranging from 41 to more than 86% of the total flora in CDA and PDA. Whereas *Penicillium* and *Alternaria* are uncommon. Finally, the genus *Cladosporium*, *Fusarium* and *Ulocladium* are less abundant in the wheat varieties analyzed. Among these molds at least two species of the genus *Aspergillus* are potentially toxigenic.

The phytochemical analysis of methanol and aqueous extracts of the seeds of *Citrullus colocynthis* revealed the presence of some chemical groups (total polyphenols, steroids and alkaloids) that can express the desired antifungal activities. To calculate the index antifungal, the antifungal activity of extracts was tested by the method of micro-dilution in a solid medium. The results suggest that the methanol extract has completely inhibited mycelial growth of *A. fumigatus* and *A. Niger* with MFC = 2.5% (25mg/ml) and *A. ochraceus* with MFC = 0.5% (5 mg / ml), the index antifungal is 100%. At the same concentration of 2.5% (25mg/ml) the aqueous extract inhibited mycelial growth of *A. ochraceus*. Both extracts have good power antimycotoxinogénic. The synthesis of AFB1 and OTA is blocked in the presence of extracts in the mid YES. The results show that the methanol and aqueous extracts of the seeds *of Citrullus colocynthis* used at low concentrations can have great potential for biological control of fungi in food.

Key words: wheat, *Citrullus colocynthis*, aqueous extract, methanol extract, phytochemical analysis, index antifungal, antimycotoxinogénic power.

الملخص:

دراسة نشاط المستخلصات المائية و المثانولية لبذور نبات الحنظل على بعض الفطريات المعــزولة من القمح اللين المخزن.

المستخلصات النباتية ومكوناتها لها تاريخ طويل كعامل مضاد للفطريات بينما استعمالها كحافظ للقمــح اللين نادرا ما درست. هذا العمل يرتكز على دراسة نشاط المستخلصات المائية و المثانولية لبذور نــبات الحنظل, الذي هو نوع من النباتات العطرية و الطبية المستعمل في الصحراء الجزائرية, ضد بعض الفـــــطريات و سمومها المعزولة من القمح اللين.

دراسة نوعية القمح اللين المحلي و المستورد أظهرت أن نسبة تلوث القمح اللين المستورد بالفـــطريات أكثر من نسبة تلوث القمح المحلي. لقد أظهرت الدراسة أن نوع الفطر *Aspergillus* و الممثل بأصـــناف متنوعة وجد بنسبة تتراوح ما بين 41% و 86% في وسط الزرع CDA و PDA. الفـــطريات *Penicillium* و *Alternaria* وجدت بنسب قليلة، و أخيرا الفطريات *Cladosporium*، *Ulocladium* و *Fusarium* كانت جد قليلة في كل من نوعي القمح المستورد و المحلي. من بين هده الفطريات صنفين من النـــــــوع *Aspergillus* وجدتا مفرزتين للسموم.

التحليل الكيميائي النباتي للمستخلصات المائية و المثانولية لبذور نبات الحنظل أظـــــهرت وجـــود بعض المجموعات الكيميائية (البولي فنول الكلي, الستيرويد و الألكلويد) التي يمكن أن تقوم بالأنشطة المطلوبة ضد الفطريات. دراسة نشاط مستخلصات بذور الحنظل أثبتت أن المستخلصات المثانولية منعت تماما نمـــــو الفطرين *A.fumigatus* و *A.niger* عند التركيز 2.5% (25ملغ/مل) و الفطر *hraceusA.oc* عنـــــد التركيز 0.5% (5ملغ/مل). عند التركيز 2.5% (25ملغ/مل) مـنع المـــستخلص المائي لبـــذور الحنظل نمو الفـــــــطر *A.ochraceus*. المستخلصان المذكوران منعا تركيب الســــــمين OTA و AFB1 المـــــــفرزين من طرف الفـــــــطرين *A.ochraceus* و *A.flavus* في وسط الزرع YES.

النتائج بينت أن المـــــــستخلصات المائية و المثانولية لبذور نبات الحنظل و المستعملة بتراكيز ضعيفة يمكن لها أن تلعب دورا هاما في المـــــراقبة البيولوجية للفطريات الموجودة في المواد الغذائية.

الكلمات المفتاحية : القمح اللين، الحنظل، مستخلص مائي، مستخلص ميثانولي، التحليل الكيميائي النباتي، مضاد فطري.