



الشعبية الجمهورية الجزائرية الديمقراطية  
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie

قسم: الميكروبيولوجيا

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Biotechnologie des mycète

Intitulé :

---

## Activité antifongique de quelques extraits d'une plante endémique sur des moisissures du blé stocké

---

Présenté et soutenu par : ALLECHE Nousseiba

Le : 04/07/2017

**Jury d'évaluation :**

**Président du jury :** Mr. KACEM CHAOUCHE N.

Pr - UFM Constantine.

**Rapporteur :** Mme. CHERFIA Radia

M.A.A- UFM Constantine.

**Examineurs :** Mme. GHORRI Sana

M.A.B- UFM Constantine.

*Année universitaire  
2016 - 2017*

## **Remerciement**

*Avant toute chose nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé la force et les moyens afin de pouvoir réaliser ce travail.*

*Au terme de ce travail nous adressons tout d'abord nos sincères remerciements à notre encadreur*

***M<sup>elle</sup> Cherfia Radia**, Maitre assistante à l'université des frères Mentouri-Constantine- pour avoir dirigé ce travail et accepté d'encadrer, pour ses conseils et ses orientations.*

***Mme GHOURI Sana**, M.C.B à l'université des frères Mentouri-Constantine- pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*A monsieur le président du jury, **Kacem Chaouche Noredine**, professeur à l'université des frères Mentouri-Constantine- et directeur du laboratoire de Mycologie, Biotechnologie, et Activité Microbienne(LaMyBAM).*

*Nous remercions également le personnel de la bibliothèque.*

*Le chef de département de microbiologie: Monsieur **Farhati**.*

*A tous les enseignants de Départements de microbiologie*

*A monsieur le doyen.*

## *Dédicaces*

*Avec l'aide de dieu, j'ai pu faire se modeste travail que je dédie :*

à mes très chers parents, ma mère, **chaoui sakina** qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie.

Mon père, **lakhdar** qui doit être fier de moi

à mon très cher Mari : Mr **alleche youcef** reçois à travers ce travail tout mon respect ma gratitude et ma profonde reconnaissance pour son soutien, son vrai amour, ces conseils , sa présence dans ma vie.

à mon petit cher ange **kanzi Ybrahim** parce q' il est présent de tous moments dans ce travail.

à Ma cher grand-mère **sakina**, Mes très cher sœurs **khadidja et oumaïma**

à toute ma famille **Alleche et Chaoui**

Mes amies qui ont pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

## Liste des abréviations

**CCM** : Chromatographie couche mince

**CMI** : Concentration minimale inhibitrice

**DMSO**: Diméthylsulfoxyde

**DO** : Densité optique.

**EAF** : Extrait aqueux feuilles

**EAT** : Extrait aqueux tiges

**EMeOH** : Extrait méthanolique

**EMF** : Extrait méthanolique feuilles

**EMT** : Extrait méthanolique tiges

**mg**: Miligramme

**Milieu PDA** : Milieu Potatoes Dextrose Agar

**mm**: Millimètre

**Rf** : Rapport frontale

**PI** : Pourcentage d'inhibition

**R%** : Rendement

**Aw** : Activity water

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01:</b> Classification botanique du blé .....	04
<b>Tableau 02:</b> les principales moisissures contaminant les céréales .....	07
<b>Tableau 03:</b> Couleur et rendement des différents extraits de <i>Calycotome spinosa</i>	
<b>Tableau04:</b> Souches testées	
<b>Tableau 05 :</b> Aspect macroscopique et microscopique des souches fongiques B ;G ; H ;D ;I et C) .....	29
<b>Tableau06:</b> Aspects macroscopiques et microscopiques des souches fongiques de Souche E et F.....	30
<b>Tableau07:</b> Aspects macroscopiques et microscopiques des souches fongiques (souche A et souche J).....	31
<b>Tableau 08:</b> Couleur et rendement des différents extraits de <i>Calycotome spinosa</i> .....	32
<b>Tableau09:</b> Souches testées.....	33
<b>Tableau 10:</b> Taux d'inhibition des moisissures.....	33
<b>Tableau11 :</b> Zone d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits sur les bactéries à Gram positif.....	37
<b>Tableau 12 :</b> Zone d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits sur les bactéries à Gram négatif.....	39
<b>Tableau 13 :</b> Concentration minimal inhibitrice des quatre extraits.....	41

## Liste des figures

<b>Figure1</b> : Symptômes de la tache septorienne causée par <i>Septoria tritici</i> (Magan et Lacey, 1988) .....	05
<b>Figure2</b> : Symptômes de septoriose sur feuille de blé dur .....	06
<b>Figure 3</b> : Blé de stockage altéré par <i>Aspergillus</i> et <i>Penicillium</i> .....	06
<b>Figure 4</b> : <i>Calycotome spinosa</i> .....	12
<b>Figure 5</b> : Ensemencement des grains.....	18
<b>Figure 6</b> : <i>Calycotome spinosa</i> (Mars 2017).....	20
<b>Figure 7</b> : <i>C. spinosa</i> séché puis finement broyé .....	21
<b>Figure 8</b> : Triage des grains du blé dur .....	23
<b>Figure 9</b> : Résultats d'isolement des moisissures à partir du blé dur.....	27
<b>Figure 10</b> : Aspects macroscopiques des isolats purifiés.....	28
<b>Figure 11</b> : Activité antifongique des extraits EMF et EAF sur les isolats fongiques.....	35
<b>Figure 12</b> : Activité antifongique des extraits EAT et EMT sur les isolats fongiques.....	36
<b>Figure13</b> : Zone d'inhibition de l'activité antibactérienne des bactéries gram positif.....	38
<b>Figure14</b> : Zone d'inhibition de l'activité antibactérienne des bactéries gram négatif, 1 : 25 mg /ml, 2 :50mg/ml, 3 :100mg/ml , 4 : 150 mg/ml 5 : 200mg/ml, 6 :DMSO.....	39
<b>Figure 15</b> : Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	42
<b>Figure16</b> : Histogramme représente les polyphénols totaux des quatre extraits.....	43
<b>Figure 16</b> : Activité antifongique des extraits EMF et EAF sur les moisissures isolés.....	41

<b>Figure 17 :</b> Activité antifongique des extraits EAT et EMT sur les moisissures isolés....	42
<b>Figure 18 :</b> Courbe d'étalonnage de l'acide gallique.....	43
<b>Figure 19 :</b> Histogramme représente les polyphénols totaux des quatre extraits.....	44

# Sommaire

1. Introduction.....	1
2 Revue bibliographique.....	4
2.1 Le blé.....	4
2.1.1 Généralités sur le blé.....	4
2.1.2 Importance alimentaire.....	4
2.1.3 Origine et diversité du blé dur en Algérie.....	4
2.1.4 Classification du blé dur.....	5
2.1.5 Moisissures des céréales.....	6
2.1.5.1 Mycètes de champ.....	6
2.1.5.2 Mycètes de stockage.....	7
2.1.6 Effets néfastes des altérations.....	7
2.1.5.3 Flore intermédiaire`.....	8
2.2 La famille des Fabaceae.....	9
2.2.1 Généralité.....	9
2.2.3 Caractères botaniques de la famille .....	9
2.2.3.1 Appareil végétatif.....	9
2.2.3.2 Appareil reproducteur.....	10
2.2.3.3 Phylogénie.....	10
2.2.4 Importance économique des fabacees.....	11
2.2.5 Importance thérapeutique.....	11
2.3 Le genre <i>Calycotomes</i> .....	12
2.3.1. Description botanique.....	12
2.3.2.Monographie de <i>Calycotome spinosa</i> .....	12
2.3.3 Classification de la plante.....	13
2.3.4 Nomenclature.....	14
2.3.5 Répartition géographique.....	14
2.3.6 Utilisation médicinales.....	14
2.3.7 Étude chimique .....	14
2.4 Métabolites secondaires .....	15
2.4.1. Généralités.....	15
2.4.2 Intérêt thérapeutique des métabolites secondaires.....	16
2.4.3 Classification.....	16
2.5 Polyphénols.....	16
2.5.1. Généralités.....	16

2.5.2 Classification.....	16
2.5.3 Intérêts thérapeutiques des polyphénols.....	17
3 Matériels et méthodes .....	18
3.1 Isolement des mycètes.....	18
3.2 Purification des isolats.....	18
3.3 Identification des isolats.....	18
3.4 Conservation des souches.....	19
3.2.2 Préparation de la plante (feuilles et tiges) .....	21
3.2.3 Extraction des métabolites de la plante (feuilles et tiges) .....	21
3.2.3.1 Préparation des extraits méthanolique et aqueux.....	21
3.2.3.2 Détermination du rendement des extraits secs.....	22
3.3 Activité antimicrobienne.....	22
3.3.1 Préparation des milieux de cultures.....	22
3.3.2 Stérilisation du matériel .....	22
3.3.3. Analyse mycologique.....	23
3.3.3.1 Triage des grains.....	23
3.3.3.2 Désinfection de la surface des grains.....	23
3.3.4 Activité antifongique .....	23
3.3.5 Activité antibactérienne.....	24
3.3.5 .1 Préparation des dilutions d'extraits de <i>C. spinosa</i> .....	24
3.3.5 .2 Préparation des disques.....	24
3.3.5.3 Réactivation des souches bactériennes.....	24
3.3.5.4 Préparation de l'inoculum.....	25
3.3.5 .5 Ensemencement et dépôt des disques.....	25
3.3.5.6 Lecture des antibiogrammes.....	25
3.3.5 .7 Détermination des CMI .....	25
3.4 Analyse phytochimique .....	26
3.4.1 Dosage des polyphénols.....	26

4 Résultats .....	27
4.1.1 Isolement des souches.....	27
4.1 Analyses mycologiques du blé dur.....	27
4.1.2 Purification des souches .....	28
4.1.3 Identification.....	29
4.2 Détermination des rendements d'extraction .....	32
4.3 Activité antimicrobienne des extraits.....	33
4.3.1 Activité antifongique.....	33
4.3.1.1 Tri des souches testées.....	33
4.3.1.2 Taux d'inhibition de la croissance mycélienne.....	33
4.3.2 Activité antibactérienne.....	37
4.3.2 Concentration minimal inhibitrice(CMI) .....	41
4.4 Dosage des composés phénoliques totaux .....	42
5 Discussion	
6 conclusions	
7 résumés	

# Introduction

# 1. Introduction

---

## 1. Introduction

La protection des cultures joue un rôle essentiel pour assurer la sécurité et la salubrité des aliments en évidence que les maladies sont probablement la plus grande contrainte à augmenter la production et le rendement globale de la récolte et un du facteur majeur qui limite leur qualité (**Morcia et al., 2015**).

Il est reconnu que les graines de céréales constituent depuis toujours la principale ressource alimentaire de l'homme et des animaux domestiques et possèdent un pouvoir nutritionnel important (**Multon, 1982; Molinié et Pfohl-Leszhowicz, 2003**).

Dans la plupart des cas, la production des céréales est assurée par une seule récolte dans l'année alors que la période de consommation est prolongée toute au long de l'année, d'où la nécessité du stockage. Cette nécessité est renforcée par l'importation des céréales dont leur production locale est insuffisante (blé dur, blé tendre et maïs) ou inapplicable (riz) (**Belyagoubi-larbi, 2007**) . Les céréales sont des produits stockés à long terme et présentent une facilité pendant leur transport (**Doumandji et al., 2003**).

Durant le développement de la civilisation indo-européenne, le blé est devenu la principale céréale des peuples occidentaux sous climat tempéré. Le blé est l'une des premières plantes introduites en cultures, en raison de nombreux caractères favorables (facilité de stockage et de transport, large zone de culture) (**Yves et De buyser, 2001**).

Malheureusement, de nombreux agents de détériorations (vertèbres, insectes, moisissures) sont la cause de la perte d'une grande partie des récoltes de céréales. Selon **Pfohl-Leszkowicz(1999)**, les moisissures et leurs mycotoxines entraînent à l'échelle mondiale des pertes estimées de 5 à 10% des céréales et leurs dérivés.

Les moisissures constituent un agent de détérioration très important. Ils sont omniprésents dans la nature et possèdent un arsenal enzymatique très varié, ce qui leur permet de croître sur divers substrats. Les moisissures diminuent la qualité technologique (taux du gluten) et sanitaire (allergie, agents toxiques responsables de graves intoxications humaines et animales: Mycotoxines), réduisant la valeur nutritionnelle, modifiant l'aspect organoleptique et enfin provoquant des problèmes économiques due aux coûts de détoxification des grains ou les rejets des produits contaminés (**Dubois et Flodrops, 1987 ; Belyagoubi-larbi, 2007**).

# 1. Introduction

---

Plusieurs moisissures notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* sont connues pour être des contaminants des produits agricoles et/ou pour leur capacité à produire des métabolites secondaires toxiques (**Doyle et al., 1998 ; Meyer et al., 2004**). Ces moisissures causent des pertes de rendement pouvant atteindre 30% en cas de développement épidémique (**Eyal et al, 1987**).

Actuellement, dans les structures de stockage on utilise des fongicides et des insecticides comme la phosphine, le malathox et le digran, etc...

De nombreux travaux indiquent l'apparition des résistances des moisissures vis-à-vis de ces substances chimiques. Ces substances causent à la fois des problèmes toxicologiques et écologiques.

L'utilisation des plantes médicinales est une pratique très ancienne

- Dans la cuisson et l'assaisonnement;
- Comme une source très importante pour de nombreuses substances à activités antimicrobiennes (exemple : les polyphénols interviennent dans la protection des plantes contre les différentes attaques microbiennes (surtout fongiques) risquant de causer la perte d'une grande quantité de végétation (**Bruneton, 1999**).

C'est dans cette perspective que nous avons essayé d'étudier l'action de quelques extraits d'une plante endémique et qui n'est pas fréquemment employée par la population, sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales (blé dur) comme substances naturelles alternatives des produits chimiques utilisés dans les structures de stockage.

La plante testée « *Calycotome spinosa* » a été récoltée dans la région de Constantine. Cette plante appartenant à la famille des Fabacées qui est considérée comme l'une des principales familles méditerranéennes à substances bioactives (**Guignard, 1996**).

Dans ce contexte, notre étude vise ces objectifs :

- Isolement, purification et identification des moisissures à partir du blé de stockage
- Préparation des extraits végétaux (extraits aqueux et méthanolique) à partir de *calycotome spinosa* (feuilles et tiges).

## 1. Introduction

---

-Évaluation qualitative et quantitative des propriétés antimicrobiennes des extraits préparés.

**Revue  
bibliographique**

## 2. Revue bibliographique

---

### 2. Revue bibliographique

#### 2.1 Le blé

##### 2.1.1 Généralités sur le blé

Le blé, constitue une des céréales les plus cultivées dans le monde. C'est une source importante de protéine pour l'alimentation humaine (Molkhou, 2007). En Algérie, les produits céréaliers, dont le blé, occupent une place stratégique dans le système alimentaire et dans l'économie nationale (Djermoun, 2009). Cependant, la conservation post-récolte est le seul moyen d'assurer le lien entre la récolte intervenant une fois dans l'année et la consommation qui est permanente et obligatoire (Waongo et al., 2013).

Historiquement, le blé est l'une des trois céréales les plus cultivées dans le monde, les deux autres étant le maïs et le riz (Shewry et al., 2009). D'un point de vue quantitatif, c'est une céréale cultivée avec plus de 600 millions de tonnes par an (Anonyme, 2011). Les deux principales espèces actuellement cultivées sont le blé commun ou blé tendre, riche en amidon, cultivé un peu partout dans les régions tempérées et le blé dur, riche en amidon et en gluten, cultivé dans des zones plus chaudes et plus sèches.

##### 2.1.2 Importance alimentaire

Les blés constituent la première ressource alimentaire de l'humanité, et la principale source de protéines. Ils fournissent également une ressource privilégiée pour l'alimentation animale et de multiples applications industrielles. La presque totalité de la nutrition de la population mondiale est fournie par les aliments en grains dont 95% sont produits par les principales cultures céréalières (Bonjean et Picard, 1991).

##### 2.1.3 Origine et diversité du blé dur en Algérie

L'origine du blé dur est un hybride, résultant du croisement aléatoire et naturel de l'espèce *Triticum monococcum* (sauvage) et une herbe spontanée apparentée au blé nommée *Aegilops speltoides*, toutes deux vraisemblables, puisqu'on les rencontre dans la même aire géographique (Belaid, 1996).

Les blés cultivés en Algérie appartiennent pour la presque totalité aux espèces *T. aestivum* L. (blé tendre) et *T. durum* Desf. (blé dur). A l'intérieur de chaque espèce on trouve de nombreuses variétés botaniques. En effet, la diversité des blés algériens a été à l'origine,

## 2. Revue bibliographique

---

étudiée à partir des caractères morphologiques. D'autres paramètres tels que la taille, la forme de l'épi, la position des barbes ont été pris en considération afin de distinguer ainsi un grand nombre de populations (**Erroux, 1949**).

En Algérie, comme dans d'autres pays, le blé est souvent stocké dans des sacs en jute et des pots de terre sous des conditions d'humidité et de température défavorables. Cependant, il a été observé par beaucoup de chercheurs que les céréales et les graines de légumineuse subissent des changements physiologiques et biochimiques pendant le stockage dans des conditions similaires. (**Magan et al., 2003**).

### 2.1.4 Classification du blé dur

La plupart des céréales, herbacée, annuelle, monocotylédone, appartiennent à la famille des Graminées et/ou Poacées, parmi les genres de cette famille: le blé, l'orge, l'avoine, le seigle, le maïs, le riz, le millet, le sorgho. Les unes appartiennent à la sous-famille des Festucoïdées : blé, orge, avoine, seigle; les autres à la sous-famille des Panicoïdées: maïs, riz, sorgho, millet. Le blé dur est une céréale autogame appartenant à l'ordre des Graminales et/ou Poales, famille des Graminae et/ou Poaceae (**Rudolphe, 2001**). Une classification détaillée est donnée par le tableau ci-dessous

**Tableau 1:** Classification botanique du blé dur

Embranchement	Spermaphytes
Sous embranchement	Angiospermes
Classe	Monocotylédones
Ordre	Commélimiflorales
Sous ordre	Poales
Famille	Graminae ou Poaceae
Genre et espèce	<i>Triticum durum</i>

## 2. Revue bibliographique

---

### 2.1.5 Moisissures des céréales

Plus de 150 espèces de moisissures filamenteuses ont été trouvées sur les grains de céréales comme contaminants extérieurs. 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 (WA), la température, la présence d'oxygène, la nature du substrat et le pH (Jouany et Viannikouris, 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).



**Figure1** : Symptômes de la tache septorienne causée par *Septoria tritici* (Magan et Lacey, 1988)

#### 2.1.5.1 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).

## 2. Revue bibliographique

---



**Figure2** : Symptômes de septoriose sur feuille de blé dur (Akinsanmi *et al.*, 2004)

### 2.1.5.2 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 ( $I'Aw$ ) (Larpent, 1990)



**Figure 3** : Blé de stockage altéré par *Aspergillus* et *Penicillium*

### 2.1.5.3 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 conditions particulières, tels que ; *Cladosporium*, *Trichoderma* et surtout les mucorales comme

## 2. Revue bibliographique

---

*Rhizopus*, *Absidia*, *Mucor*, accompagnée avec des levures du genre *Candida* et *Torulopsis* (Godon et Loisel, 1997).

### 2.1.6 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).

**Tableau 2:** les principales moisissures contaminant les céréales (adapté de Pfohl- Leszkowicz, 1999 in Molinié et Pfohl-Leszkowicz, 2003).

Champignons	Toxines	Denrées
<i>Claviceps</i>	Alcaloïdes de l'Ergot	Blé et dérivés, seigle
<i>Fusarium</i>	Trichothécènes (DON, NIV, toxine T-2, <b>DAS</b> ), Zéaralénone, Fumonisines, Fusarine, Monil i formine	Blé, maïs, orge, riz, seigle, avoine
<i>Aspergillus</i>	Aflatoxines , Stérigmatocystine, Ochratoxine A	Maïs, blé
<i>Penicillium</i>	Patuline, Citrinine, Pénitrem	Blé, riz, orge

### 2.2 La famille des Fabaceae

## 2. Revue bibliographique

---

### 2.2.1 Généralité

Les Fabaceae constituent une des plus grandes familles des plantes à fleurs, avec plus de 730 genres et 19 400 espèces, réparties aussi bien en milieu tempéré que tropical (**Wojciechowski et al., 2004**). Les formes arborescentes prédominent dans les pays chauds et les formes herbacées dans les régions tempérées (**Dupont et al., 2007**).

Néanmoins, la prédilection des plantes de cette famille pour les habitats arides ou semi-arides est reliée à leur métabolisme dépendant de l'azote, qui est considérée comme une adaptation aux variations climatiques et imprévisibles de l'habitat. En effet, la fixation de l'azote via la symbiose légumineuses-rhizobium permet aux plantes de cette famille d'obtenir des taux élevés en azote ammoniacal au niveau de leurs racines en fonction de la demande de leur métabolisme (**Wojciechowski et al., 2004**).

Cette famille est composée de variétés horticoles et beaucoup d'espèces sont récoltées dans un but alimentaire, tant pour l'alimentation humaine (haricot, pois, fève, soja) qu'animale (trèfle, luzerne, sainfoin), pour leur huile (arachide, soja), leurs fibres, comme combustible, pour leur bois, leur utilisation en médecine (spartéine extraite du genêt à balais, réglisse) ou en chimie (**Wojciechowski et al., 2004**).

### 2.2.3 Caractères botaniques de la famille

Les plantes de la famille des Fabaceae possèdent plusieurs caractères morphologiques en commun. Néanmoins, on observe aussi dans cette famille de très nombreux types floraux, dues à plusieurs tendances évolutives, plus ou moins synchrones, et en particulier, une réduction du nombre des étamines et la création d'une fleur zygomorphe<sup>1</sup>. Les feuilles également des plantes de cette famille présentent une évolution morphologique (**Morel, 2011**).

#### 2.2.3.1 Appareil végétatif

Les **racines** sont généralement pivotantes et laissent apparaître des nodosités à *rhizobium* qui se forment si le sol est pauvre en azote (**Dupont et al., 2007**).

Les **feuilles** sont généralement alternes, pennées ou trifoliolées et stipulées. Cependant on peut noter quelques évolutions : la foliole terminale peut être absente (fève) ou en forme de vrille (vesce), les folioles sont remplacées par des épines (ajonc), les stipules font place à des épines (robinier faux acacia), le nombre de folioles peut être réduit (trèfle, genêt), la nervation peut être de type palmée (lupin) (**Morel, 2011**).

## 2. Revue bibliographique

---

### 2.2.3.2 Appareil reproducteur

Les **inflorescences** sont des grappes plus ou moins allongées.

Les Fabaceae les plus primitives (Mimosoidées) possèdent un périanthe régulier et réduit, avec des étamines très nombreuses. Chez les plus évoluées, on observe une réduction du nombre d'étamines à 10 et la fleur devient zygomorphe (**Morel, 2011**).

Toutes les Fabaceae possèdent un ovaire formé d'un seul carpelle. Celui-ci est supère et surmonté d'un style et d'un stigmate (**Morel, 2011**).

Le fruit, élément le plus constant et qui caractérise cette famille, est appelé gousse ou légume. Il s'agit d'un fruit qui s'ouvre en général à maturité grâce à une double ouverture : ventrale et dorsale. Chez certaines espèces, la gousse subit des transformations.

Celle-ci peut présenter des étranglements entre les graines (gousse lomentacée, indéhiscente), elle peut devenir pauciséminée (jusqu'à une seule graine). En fonction des espèces, la gousse est sèche ou charnue, aplatie ou comprimée, spiralée, arquée, ailée, segmentée, articulée, verdâtre ou de couleur vive. Sa taille va de quelques centimètres à une trentaine de centimètres (**Morel, 2011**).

Le nombre d'ovules est variable. Ils évoluent pour former une **graine** arquée, exalbuminée, qui est d'ailleurs souvent riche en composés à haute valeur alimentaire comme : l'amidon (pois, fèves, lentilles), des lipides (arachides, graines de soja), des protéines (graines de soja) (**Morel, 2011**).

### 2.2.3.3 Phylogénie

L'étude phylogénétique de cette famille a été commencée avec le gène chloroplastique *rbcL4*, confirmant l'origine monophylétique de cette famille (**Wojciechowski et al., 2004**). Les Fabaceae peuvent être réparties en 4 sous-familles selon **l'APG III (2009)**:

- La sous-famille de Bauhinoïdes, avec les arbres à Orchidées (*Bauhinia*) et les arbres de Judée (*Cercis*)
- La sous-famille des Mimosoïdeae
- La sous-famille des Caesalpinoïdeae
- La sous-famille des Papilionoïdeae ou Faboïdeae comprenant le genre *Derris*.

### 2.2.4 Importance économique des fabacees

## 2. Revue bibliographique

---

L'intérêt agronomique des fabacées provient en premier lieu de leur aptitude à s'associer à des bactéries du sol (*Rhizobiacées*), spécialement la bactérie « *Rhizobium leguminosafum* », pour former des organes symbiotiques racinaires « nodules » au sein desquels ces bactéries transforment l'azote atmosphérique en une forme assimilable par la plante, grâce à quoi, les fabacées peuvent produire en abondance des protéines végétales même en l'absence de fertilisation azotée. Pour cela, elles sont dites plantes améliorantes (Cooke, 1971 ; Shibnath Ghosal, 1986).

L'intérêt alimentaire découle du fait que les fabacées constituent une source très importante de protéines et lipides et rentrent dans l'alimentation humaine et animale (Plotis et al, 1973 ; Xue et al., 1988 ) ; tels que le Pois (*Pisum*), la Féverole (*Faba*), le Haricot (*Phoscolus*), le Pois chiche (*Cicer*) et les Lentilles (*Ervum*), ou encore le soja et les arachides.

L'intérêt industriel résulte du fait que beaucoup d'espèces de cette famille fournissent des produits industriels tels que le Soja qui est utilisé à grande échelle dans l'élevage industriel, les *Derris* et les *Lonchocarpus* qui donnent les roténoïdes insecticides (Plotis et al., 1973).

### 2.2.5 Importance thérapeutique

Beaucoup d'espèces de fabacées ont des propriétés thérapeutiques et sont utilisées en médecine traditionnelle. Dans ce qui suit, nous allons citer quelques exemples d'espèces de très grande importance alimentaire et ayant des propriétés médicinales (Hunneck et - Lehn, 1963 ; Sawadogo et al., 1985 ).

- *Trigonella foenum graecum* (**fenugrec**) : Son nom vernaculaire **halba**. C'est une plante herbacée originaire du Proche Orient, aujourd'hui largement cultivée. Le fenugrec est utilisé dans le traitement des plaies, diarrhées, acné, déshydratation, anémie, bronchite, rhumatismes, maux d'estomac, hypertension artérielle, constipation. Cette plante est également consommée comme fortifiante par les femmes après l'accouchement. Les graines ont des propriétés nutritives importantes et des effets hypocholestérolémiants, elles sont traditionnellement utilisées comme stimulant de l'appétit et pour la prise de poids.
- *Arachis hypogaea* L. (**Arachide**) : l'huile d'Arachide est utilisée comme solvant médicamenteux. Il a également des propriétés vitaminiques P : action antihémorragique au niveau des capillaires ( Djerassi, et a., 1953.)

## 2. Revue bibliographique

---

### 2.3 Le genre *Calycotomes*

#### 2.3.1 Description botanique

Le genre *Calycotome* appartient à la famille des Fabacées. Ces dernières constituent la troisième famille la plus importante du règne végétal (environ 16000 espèces) après les Astéracées et les Orchidacées. Les *Calycotome* sont des arbrisseaux épineux, genêt à tiges élancées et écartées, formant des buissons qui peuvent atteindre 2 mètres de hauteur. Leurs rameaux sont verts, puis bruns en vieillissant, et se terminent en épines (**Quèzel et Santa, 1963; Talavera et al., 1999; García Murillo, 1999**).

#### 2.3.2 Monographie de *Calycotome spinosa*

Le *Calycotome* est présent sous forme d'un arbuste épineux pouvant atteindre 1 et même 2 m de hauteur (**Figure 4**) dans notre région. Les rameaux fortement imbriqués, ce qui rend parfois les matorrals occupés par cette espèce difficilement pénétrable. Cette plante est fortement inflammable et contribue à la propagation des incendies.

La racine porte habituellement des nodosités renfermant des bactéries permettant la fixation de l'azote atmosphérique. Les feuilles trifoliées et les fleurs de couleur jaune sont caractéristiques de la famille. Cultivée comme plante ornementale, les abeilles récoltent un nectar très sucré, peu abondant à la base des tubes d'étamines. Il préfère les matorrals siliceux (**Damerdji et Djeddid, 2012**).

*Calycotome spinosa* L Link est un arbuste épineux pouvant atteindre 1 et même 2 m de hauteur. Les rameaux sont fortement imbriqués, la racine porte habituellement des nodosités. Les feuilles trifoliées et les fleurs de couleur jaune (**Damerdji et Djeddid, 2012**).

## 2. Revue bibliographique

---



**Figure 4 :** *Calycotome spinosa*

### 2.3.3 Classification de la plante

La position systématique de cette espèce (**Damerdji et Djeddar, 2012**) est :

Embranchement	Spermaphytes
sous Embranchement	Angiospermes
Classe	Eudicotes
sous Classe	Eurosidées
Ordre.	Fabales
Famille.	Fabacées
Genre espèce	<i>Calycotome spinosa</i> L.(Link)

## 2. Revue bibliographique

---

### 2.3.4 Nomenclature

- Nom commun : Épineux, balai, épineux, genêt
- Nom scientifique : *Calycotome spinosa* L Link
- Nom vernaculaire : Genêt épineux ou Calycotome épineux.
- Nom arabe : Guendoul (**Damerdji et Djeddid, 2012**).

### 2.3.5 Répartition géographique

Le *Calycotome* préfère les sols siliceux. En région méditerranéenne, les *Clycotomes* sont représentés principalement par trois espèces (*C. spinosa*, *C. villosa*, *C. villosa* subsp. *intermedia*) (**Quèzel et Santa, 1963; Domínguez, 1987**). Lorsqu'on le rencontre dans la garrigue, c'est le signe d'une certaine pauvreté en calcaire. On le trouve dans les forêts de pin maritime, dans les subéraies et le maquis qu'il contribue à rendre difficilement pénétrable. Le *CALYCOTOM* vit dans les montagnes proches du littoral en Afrique du Nord et en Espagne méridionale (à savoir le nord de l'Algérie, le nord de la Libye, l'Italie, France et Espagne) (**Quèzel et Santa, 1963; Domínguez, 1987**).

### 2.3.6 Utilisation médicinales

Malgré leurs avantages qui résident dans leur capacité de fixer l'azote atmosphérique et d'enrichir le sol en produits azotés grâce aux nodosités sur leurs racines, le genêt épineux est utilisé dans la phytothérapie (**Mokhtari., 2012**).

Dans les indications thérapeutiques le *Calycotome spinosa* L est utilisée comme un antiictérique (**Sari., 2013**).

Les fleurs et les feuilles de *Calycotome spinosa* L Link sont riches en flavonoïdes, qui sont utilisées dans le traitement des maladies cardiovasculaires, des cas de cancer, et des ulcères gastroduodénaux (**Larit et al., 2012**). Les genêts sont capables grâce aux nodosités sur leur racines, de fixer l'azote atmosphérique et d'enrichir le sol en produits azotés. Les ruminants évitent cette plante à cause de ses épines.

Le genêt épineux a des propriétés antioxydants et anti inflammatoires (**Larit et al., 2012**).

### 2.3.7 Étude chimique

Les *Calycotomes* sont des espèces riches en métabolites secondaire. Ils ont fait l'objet de plusieurs travaux. On cite dans ce paragraphe les travaux phytochimiques qui leurs ont été consacrés.

## 2. Revue bibliographique

---

**El Antri et al., (2010)** ont contribué à l'étude des graines de *C. villosa* subsp. *intermedia*. Leurs travaux ont porté sur l'identification de deux flavonoïdes. Il s'agit de 3,5,7,4'-tétrahydroxy-3'-méthoxyflavone et 3,5,7,4'-tétrahydroxy-8-méthoxyflavone. Dans cette étude, l'activité vasodilatatrice des flavonoïdes isolés a été démontrée. Sur le même organe de l'espèce, une étude a été consacrée aux alcaloïdes. Deux tétrahydroisoquinoline ont été isolés (**El Antri et al., 2010**).

De nombreux travaux ont permis de dévoiler la présence de composés flavonoïdes, alcaloïdes, anthraquinones (**Dessi et al., 2001; El Antri et al., 2004**). Cependant, très peu de recherches ont été menées sur l'huile essentielle de la partie aérienne de *C. villosa*. La composition chimique de l'huile rapportée par **Loy et al., (2001)** a été étudiée partiellement. Les auteurs ont identifié 21 composés représentant 26% de la composition totale de l'huile essentielle. Cette dernière est caractérisée principalement par eicosane (1,5%), heneicosane (2,8%), pentacosane (2,6%), tétracosane (2,6%), tricosane (1,9%), eugénol (1,8%), isoéugénol (1,8%), fenchone (1,8%). L'activité cytotoxique de l'huile a également été évaluée par **Loy et al., (2001)**.

Les auteurs ont montré que l'huile est dotée d'une forte activité cytotoxique estimée à 0,04 µl/ml, principalement en raison de la présence de falcariol, qui possède des effets négatifs et toxiques à des concentrations relativement élevées (**Hensen et al., 1986**).

### 2.4 Métabolites secondaires

#### 2.4.1. Généralités

Les métabolites secondaires sont des molécules organiques complexes synthétisées par les plantes autotrophes (**Boudjouf, 2011**). Ce sont caractérisés généralement par de faible concentration dans les tissus végétaux (généralement quelques pourcents du carbone total, si on exclue la lignine de cette catégorie) (**Newman et Cragg, 2012**). Aussi n'exercent pas de fonction directe au niveau des activités fondamentales de la plante (**Guignard, 1996**). Biosynthétisés à partir de métabolites primaires et jouent un rôle majeur dans les interactions de la plante avec son environnement, contribuant ainsi à la survie de l'organisme dans son écosystème (**Peeking et al., 1987**).

En 1987 Plus de 8500 métabolites secondaires sont déjà connus. Les plus grands groupes sont les alcaloïdes, les terpénoïdes, les stéroïdes et les composés phénoliques. Ils présentent une

## 2. Revue bibliographique

---

énorme valeur économique (en particulier pour l'industrie pharmaceutique et la cosmétique) (**Peeking et al., 1987**).

### 2.4.2 Intérêt thérapeutique des métabolites secondaires

Les composés phénoliques en particulier les flavonoïdes seraient impliqués dans un certain nombre de fonctions :

- Ils assurent la pigmentation des fleurs, des fruits et des graines pour attirer les pollinisateurs et les disperseurs de graine,

- Représentent un système de défense contre les organismes micro pathogènes, - protègent les plantes contre les radiations UV en absorbant à la fois ces radiations et les espèces réactives de l'oxygène formées,

- Interviendraient dans la fertilité des plantes et la germination du pollen (**Schijlen et al., 2004 ; Stalikas, 2007**).

### 2.4.3 Classification

D'après leur biosynthèse, les métabolites secondaires peuvent être divisés en trois classes: Polyphenols; terpénoïdes; stéroïdes et alcaloïdes (**Hennebelle et al., 2004**).

## 2.5 Polyphénols

### 2.5.1. Généralités

Les polyphénols sont des produits du métabolisme secondaire des végétaux, caractérisés par la présence d'au moins d'un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle libre, ou engagé dans une autre fonction tels que : éther, ester, hétéroside...etc (**Bruneton, 1999**). La grande majorité de composés phénoliques dérivent de l'acide cinnamique formé par la voie du shikimate (**Gorham, 1977**). Sont solubles dans la solution de carbonate de sodium. Chimiquement, ils sont réactifs et donnent souvent lieu à des liaisons hydrogènes, ou chélater des métaux pour les O-dihydroxyphénols (catéchol); Enfin, ils sont sensibles à l'oxydation (**Gorham, 1977**).

### 2.5.2 Classification

La classification de ces substances a été proposée par (**Harborne1980**). On peut distinguer les différentes classes des polyphénols en se basant d'une part, sur le nombre d'atomes

## 2. Revue bibliographique

---

constitutifs et d'autre part, sur la structure de squelette de base, principales classes sont largement répandues (Macheix *et al.*, 2006).

- Les acides phénoliques (acides hydroxybenzoïques, acides hydroxycinnamiques).
- Les flavonoïdes.
- Les tanins et lignines (Harborne 1980).

### 2.5.3 Intérêts thérapeutiques des polyphénols

La principale caractéristique des polyphénols est qu'ils sont des agents antioxydants très puissants (Pietta 2002, Frei et Higdon 2003, Oszmianski *et al.*, 2007).

En effet, ils sont capables de piéger les radicaux libres et d'activer les autres antioxydants présents dans le corps. Ce principe a été utilisé dans la fabrication de plusieurs médicaments, comme le Daflon produit à base de diosmine. Cette même activité antioxydante permet aux polyphénols de réguler les radicaux bon-mauvais (qui peuvent être les deux), comme l'oxyde nitrique qui favorise une bonne circulation sanguine, coordonne l'activité du système immunitaire avec celle du cerveau et module la communication entre les cellules de ce dernier (Srivastava *et al.*, 2000 ; Kenny *et al.*, 2007).

En raison de ces vertus, les composés phénoliques sont largement utilisés dans les domaines thérapeutiques et pharmaceutiques. Parmi les nombreux intérêts qu'offrent les polyphénols à la santé, nous pouvons citer les suivants :

- **Activité anticancéreuse** : Les substances polyphénoliques sont capables d'activer les mécanismes naturels de la défense anticancéreuse.
- **Prévention contre les maladies cardiovasculaires** : En effet, la consommation des polyphénols favorise la protection contre les altérations cardiaques et vasculaire (Martin et Andriantsitohaina, 2002).
- **Prévention contre les maladies hormono-dépendantes** : L'exemple le plus important est la prévention contre l'ostéoporose.

# **Matériel et méthodes**

### 3. Matériel et méthodes

---

### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1 Isolement des mycètes

L'isolement des moisissures a été réalisé à partir des grains de blé dur en provenance de la région de Guelma/Boumahra (**Espèce /Variété** : Blé dur/GTADUR), superficie totale: 5 ha, avec un rendement supérieur à 50.5 qx/ha.

Les étapes d'isolement réalisées sont celles recommandées par **Moreau (1996) et Malloch (1997)**.

Sous des conditions aseptiques, les grains désinfectés sont ensemencés directement, à l'aide d'une pince stérile, dans des boîtes de Pétri contenant du PDA à raison de 10 grains par boîte. L'ensemble est incubé à 30 °C pendant 3 à 7 jours.



**Figure 5** : Ensemencement des grains

#### 3.2 Purification des isolats

Des observations quotidiennes sont effectuées dès la germination des grains et l'apparition des mycéliums. Ces derniers sont repiqués au centre de boîte de Pétri contenant un milieu PDA neuf (Annexe 1), additionné de amoxiciline (30 mg/l), puis incubé à 30°C pendant 6 jours (**Botton et al., 1990; Guiraud, 1998**).

En cas de contamination par autre souche fongique, la purification des souches contaminées est effectuée par le repiquage d'un hyphes terminal ou un disque de 6 mm au centre de boîte contenant le même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à l'obtention de souches pures (**Guiraud, 2003**).

#### 3.3 Identification des isolats

L'identification des genres de moisissures dépend d'une part, de l'examen macroscopique effectué sur un milieu solide (gélosé) coulé en boîtes de pétri et d'autre part, de l'examen microscopique :

### 3. Matériel et méthodes

---

- Examen macroscopiques (des caractères cultureux): vitesse de croissance, couleur de colonie, couleur de l'envers de colonie, etc. (**Chabasse et al., 2002**).
- Examen microscopiques : hyphes cloisonnés ou non, type et apparence du système sporal, caractéristiques de la spore asexuée (couleur, taille, septation), etc. (**Guiraud, 2003**).
  - **Observation macroscopique**

L'examen macroscopique des cultures est le premier examen effectué. L'aspect des colonies dépend du milieu utilisé, de la durée et de la température de l'incubation.

**Aspect de colonies en surface sur milieu solide, la taille, la forme, l'aspect de la surface, l'opacité, la consistance, La couleur et/ou pigment.**

- **Observation microscopique**

Comme la structure des moisissures est particulièrement fragile, une technique spéciale consiste à préparer une culture observable directement au microscope, il s'agit de la culture sur lame (**Zaitlin et al., 2003**).

Les isolats sont examinés au microscope en tant que frottis humides. Pour préparer un frottis humide, une aiguille d'inoculation est utilisée pour récupérer une petite partie de la colonie comportant les structures conidiogènes. L'échantillon est prélevé sur la bordure de la colonie car les structures fertiles sont jeunes et le nombre de spores n'est pas excessif. Une goutte de lactophénol est ajoutée à la préparation qui est recouverte délicatement d'une lamelle (**Nguyen, 2007**).

Les isolats fongiques sont identifiés selon le manuel de (**Botton et al., 1990**).

#### 3.4 Conservation des souches

##### - Glycérol 20%

Les souches fongiques purifiées sont conservées par congélation en présence de substance cryoprotectrices tel que le glycérol 20% (**Bouchet., 1999**). Une suspension de spores est préparée par raclage de la surface de culture puis conservée à  $-20^{\circ}\text{C}$  en présence du glycérol à 20%. Les cultures sont alors stockées à  $-20^{\circ}\text{C}$  en cryobilles.

### 3. Matériel et méthodes

---

#### - Gélose incliné

Les souches fongiques purifiées sont repiquées sur milieu PDA incliné. Après incubation à 30°C pendant 7 jours, les souches sont stockées à 4°C et un repiquage est réalisé tous les deux mois (Takahashi *et al.*, 2008).

Le matériel végétal est constitué de feuilles et tiges fraîches de *calycotome spinosa*. Cette plante a été récoltée dans la région d'Ain Smara (la forêt de Chattabah, Constantine-Algérie) durant le mois de Mars 2017. Elle a été identifiée par Mme. Khalfallah Nadra, professeur à l'université des Frères Mentouri- Constantine-



**Figure 6** : *Calycotome spinosa* (Mars 2017)

### 3. Matériel et méthodes

---

#### 3.2.2 Préparation de la plante (feuilles et tiges)

Le matériel végétal a été ensuite découpé puis séché à l'air libre, mais à l'abri de la lumière directe du soleil, et à température ambiante (25°C) pendant cinq jours. Enfin, les feuilles et les tiges sèches ont été pulvérisées au broyeur pour obtenir une poudre fine.

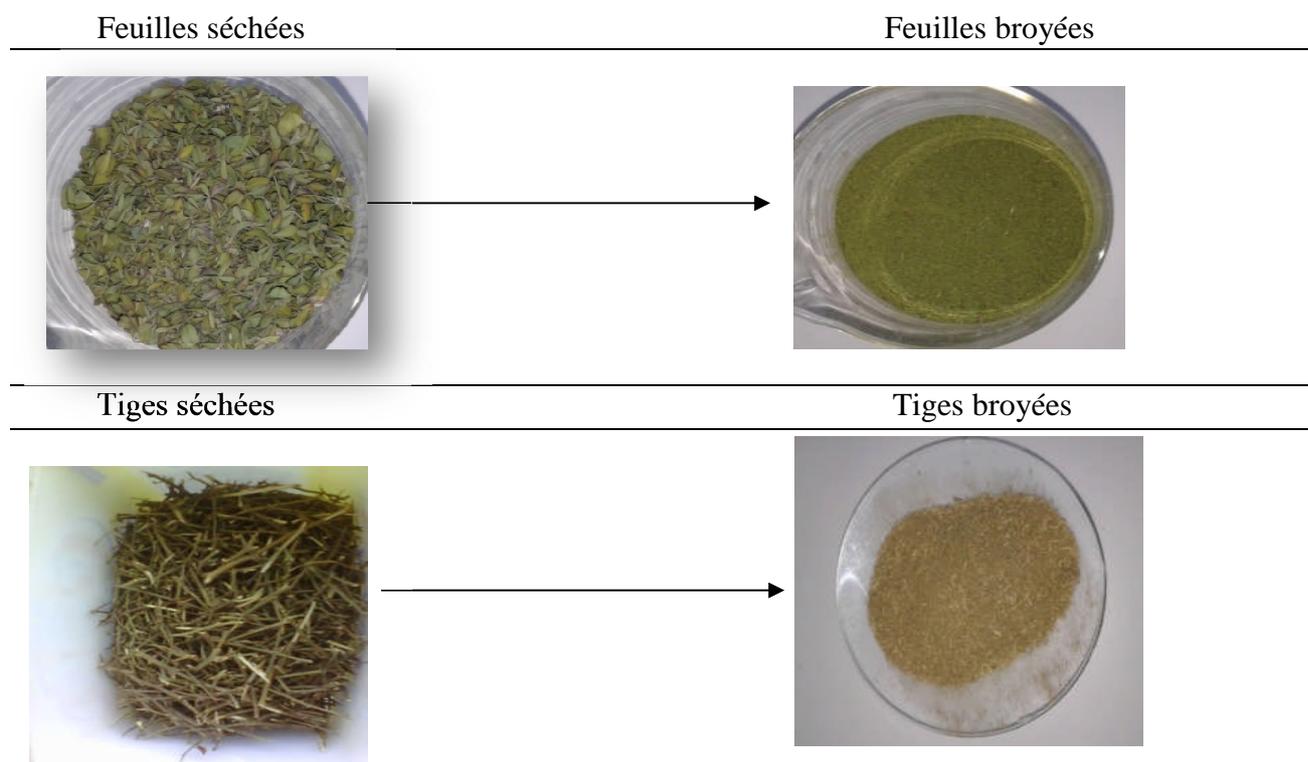


Figure 7 : *C. spinosa* séché puis finement broyé

#### 3.2.3 Extraction des métabolites de la plante (feuilles et tiges)

##### 3.2.3.1 Préparation des extraits méthanolique et aqueux

Les extractions ont été effectuées sur les tiges et les feuilles de *C. spinosa*. La technique appliquée pour l'extraction au méthanol et à l'eau distillée est celle utilisée par (Senhaji et al., 2005).

Une quantité de 20 g est prise dans un erlenmeyer, à laquelle 100 ml de solvant ont été ajoutés (méthanol 99.7 % et l'eau distillée). Après 24 heures de macération sous agitation continue à

### 3. Matériel et méthodes

---

200 tours/min, Le mélange est ensuite centrifugé à 3600 tours /min pendant 30 min à 25°C. Le surnageant est récupéré puis filtré sur papier Wattman N° 01.

Cette opération est répétée trois fois avec renouvellement du solvant afin d'épuiser le filtrat et augmenter le rendement.

A la fin de l'extraction, les extraits bruts obtenus sont évaporés en utilisant le rotavapor (HEIDOLPH) à une température de 50°C.

#### 3.2.3.2 Détermination du rendement des extraits secs

Le rendement des extraits méthanolique et aqueux 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**).

$$R \% = (m1 \times 100) / m0$$

m1 : masse en gramme de l'extrait sec ;

m0 : masse en gramme de la matière végétale sèche ;

Rd : rendement.

### 3.3 Activité antimicrobienne

#### 3.3.1 Préparation des milieux de cultures

Les milieux de cultures préparés sont :

- ✓ PDA
- ✓ Mueller Hinton

#### 3.3.2 Stérilisation du matériel

L'eau distillée, le milieu de culture, les tubes à essai utilisés dans la préparation des solutions microbiennes et les disques en papier Wattman (6 mm de diamètre) enrobés dans du papier aluminium ont été stérilisés à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes.

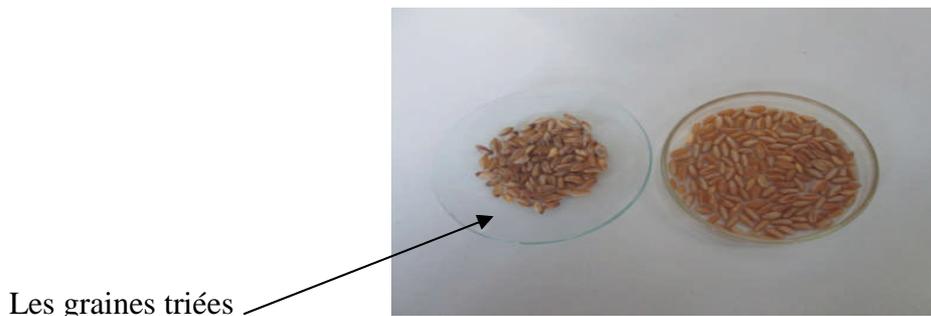
### 3. Matériel et méthodes

---

#### 3.3.3. Analyse mycologique

##### 3.3.3.1 Triage des grains

Le tri se fait en fonction de la taille, la couleur et l'aspect des grains : tout changement de taille, de couleur ou d'aspect général des grains permet de suspecter leur contamination intérieure.



**Figure 8 :** Triage des grains du blé dur

##### 3.3.3.2 Désinfection de la surface des grains

60 grains de blé dur sont désinfectés en surface. Le traitement de ces grains (désinfection superficielle) se fait par une solution de NaOCl concentré à 2% pendant 1 à 2 min. Après au moins 3 rinçages à l'eau distillée stérile, les grains sont séchés avec du papier filtre stérile pour être, ensuite, ensemencés (**Pacin et al., 2002 ; Ghiasian et al., 2004**).

##### 3.3.4 Activité antifongique

Les mêmes opérations ont été effectuées avec les souches fongiques, mais dans ce cas le milieu de culture utilisé est le milieu PDA (**Annexe I**). Les moisissures ont été réactivées pendant 7 jours à une température de 28°C avant le test.

L'inhibition de la croissance mycélienne a été déterminée en coupant des disques d'environ 5 mm de diamètre de bord d'une jeune colonie de culture de champignons et placer le disque au centre d'une boîte de Pétri sur PDA contenant 20 mg ml<sup>-1</sup> d'extraits préalablement stérilisés à partir de feuilles et tiges de *C. spinosa* (**Bautista-Baños et al., 2002**). Les boites ont été laissés à incuber à température ambiante et l'expérience s'est terminée lorsque la culture témoin (PDA sans extrait) a complètement colonisé la surface de la gélose. Les résultats ont été exprimés en pourcentage de l'inhibition de la croissance radiale dans les milieux contenant des extraits par rapport au contrôle selon la formule de **Leroux et Credet (1978)**.

### 3. Matériel et méthodes

---

$$PI (\%) = (D - d) / D \times 100$$

PI : Pourcentage d'inhibition.

D : croissance mycélienne dans les boîtes de Pétri témoins.

d: croissance mycélienne dans les boîtes essais. De plus, l'efficacité du fongicide commercial Fluconazole sandoz a été évaluée en utilisant 1 g l<sup>-1</sup> dans le milieu PDA. La lecture des antibiogrammes est faite après 4-7 jours d'incubation à 28°C.

#### 3.3.5 Activité antibactérienne

L'évaluation de l'activité antibactérienne des extraits a été réalisée par la méthode de diffusion de disque en milieu gélosé où les disques sont imbibés par 20 µl de chaque extrait (Sokmen *et al.*, 2004; Sacchetti *et al.*, 2005; Celiktas *et al.*, 2007).

##### 3.3.5.1 Préparation des dilutions d'extraits de *C. spinosa*

Les extraits de *C. spinosa* ont été dissous dans le diméthyle sulfoxyde (DMSO) pour préparer les différentes concentrations avec des dilutions successives au demi (25, 50, 100,150 et 200 mg/ml).

##### 3.3.5.2 Préparation des disques

Pour l'activité antibactérienne, des disques de 6mm de papier wattman N°1 imbibé par 20 µl des différentes concentrations des extraits EAF /EAT /EMT/EMF ont été préparés à l'aide d'une micropipette de 20 µl.

##### 3.3.5.3 Réactivation des souches bactériennes

Six souches bactériennes ont été testées : à Gram positif ; *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) et *Streptococcus* sp. À Gram négatif ; *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Salmonella abony* (NCTC 6017) et *Klebseilla* sp.

Ces souches proviennent du laboratoire de bactériologie de l'hôpital Universitaire « Ibn Badiss »- Constantine- ont été réactivées sur un milieu gélosé neuf (Mueller Hinton). A l'aide d'une anse de platine, une colonie bien isolée de chaque souche a étéensemencée dans des boites de Pétri coulées préalablement par un milieu de culture gélosé, et incubées à 37°C pendant 24h.

### **3. Matériel et méthodes**

---

#### **3.3.5.4 Préparation de l'inoculum**

Les souches bactériennes sont ensemencées dans la gélose nutritive et incubées à 37°C pendant 24h, pour optimiser leur croissance. On racle à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et identiques de chacune des souches bactériennes à tester. Décharger l'anse dans 9ml d'eau physiologique stérile, la suspension bactérienne est bien homogénéisée, son turbidité doit être équivalente à 0.5 Mc Farland ( $1.2 \times 10^7$  cellules/ml).

#### **3.3.5.5 Ensemencement et dépôt des disques**

L'ensemencement est réalisé par écouvillonnage sur boîtes de Pétri, un écouvillon est trempé dans la suspension bactérienne, puis l'essorer en pressant fermement sur la paroi interne du tube.

L'écouvillon est frotté sur la totalité de la surface gélosée, de haut en bas en stries serrées.

L'opération est répétée quatre fois en tournant la boîte de 90° à chaque fois. L'ensemencement est fini en passant l'écouvillon une dernière fois sur toute la surface gélosée. Les disques imprégnés d'extraits, de DMSO (contrôle négatif) et d'antibiotique (contrôle positif) sont déposés délicatement sur la surface de la gélose inoculée à l'aide d'une pince stérile après le séchage de la surface des boîtes.

Finalement, les boîtes de Pétri sont incubées pendant 18 -24 heures à 37°C.

#### **3.3.5.6 Lecture des antibiogrammes**

La lecture des antibiogrammes a été faite par la mesure des diamètres des halos d'inhibitions au tour des disques.

#### **3.3.5.7 Détermination des CMI**

Pour les concentrations minimales inhibitrices (CMI), il s'agit de déterminer les plus petites concentrations auxquelles les extraits présentent encore une activité antibactérienne visible à l'œil nu (Skandamis et Nycha, 2001). Des dilutions successives au demi ont permis de préparer une gamme de dilution allant de 200 à 25 mg/ml pour les extraits, en effet de chaque dilution. On a prélevé 20 µl et on la mit dans les disques. Les boîtes ensemencées ont été incubées 24 heures à 37°C.

### 3. Matériel et méthodes

---

#### 3.4 Analyse phytochimique

##### 3.4.1 Dosage des polyphénols

###### ✓ Principe

La teneur en composés phénoliques des différents extraits des tiges et des feuilles de *calycotome spinosa* a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu selon (Li *et al.*, 2007) qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) phosphomolybdique ( MoO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) de réactif de Folin par les groupement oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue. Ces derniers présentent un maximum d'absorption à 765 nm dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans l'échantillon (Georgé *et al.*, 2005).

###### ✓ Protocol

Brièvement, 1 ml de réactif de Folin (10 fois dilué) est ajouté à 200 µl d'échantillon ou standard (préparés dans le méthanol) avec des dilutions convenables (0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1), après 4 min, 800 µl d'une solution de carbonate de sodium (75 mg/ml) sont additionnés au milieu réactionnel. Après 2 h d'incubation à température ambiante l'absorbance est mesurée à 765nm.

La concentration des polyphénols totaux est calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique et est exprimée en milligramme d'équivalent d'acide gallique par gramme d'extrait (mg EAG/g d'extrait).

# Résultat

## 4. Résultat

### 4. Résultats

#### 4.1 Analyses mycologiques du blé dur

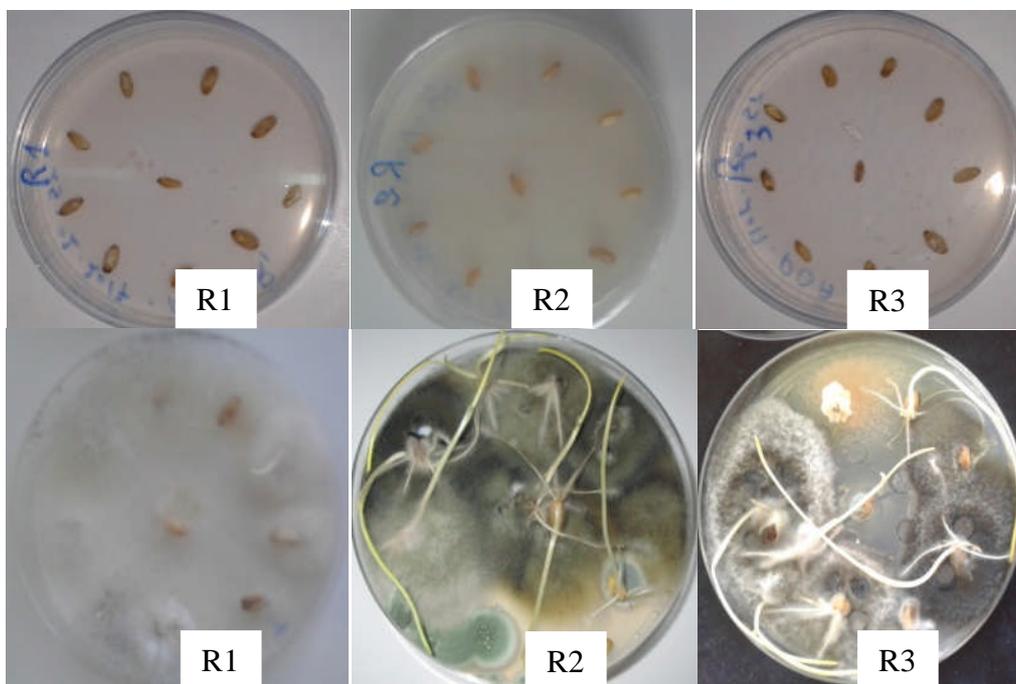
##### 4.1.1 Isolement des souches

L'isolement des moisissures nous permet d'avoir une variété des souches avec différents aspects macroscopiques et microscopiques.

Un nombre total de 17 isolats de moisissures a été isolé à partir des trois boîtes, chaque boîte contient 10 grains de blé dur analysés. Les études macroscopiques et microscopiques ont permis de mettre en évidence quatre genres fongiques (figure9), présentés dans l'ordre décroissant de prédominance comme suit: *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* et *Rhizopus*.

*Alternaria* est le genre majoritaire avec une fréquence de 76,47 % des souches isolées, représenté par deux espèces : *Alternari alternat* et *Alternaria solani*.

Vient ensuite, le genre *Penicillium* qui représente 11,76 % de l'ensemble des isolats regroupant deux espèces : *Penicillium sp.1*, *Penicillium sp.2*. Les genres *Aspergillus. sp* et *Rhizopus sp*. Représentent respectivement 5,88% et 5,88% de l'ensemble des souches isolées avec une seule espèce pour chacun.



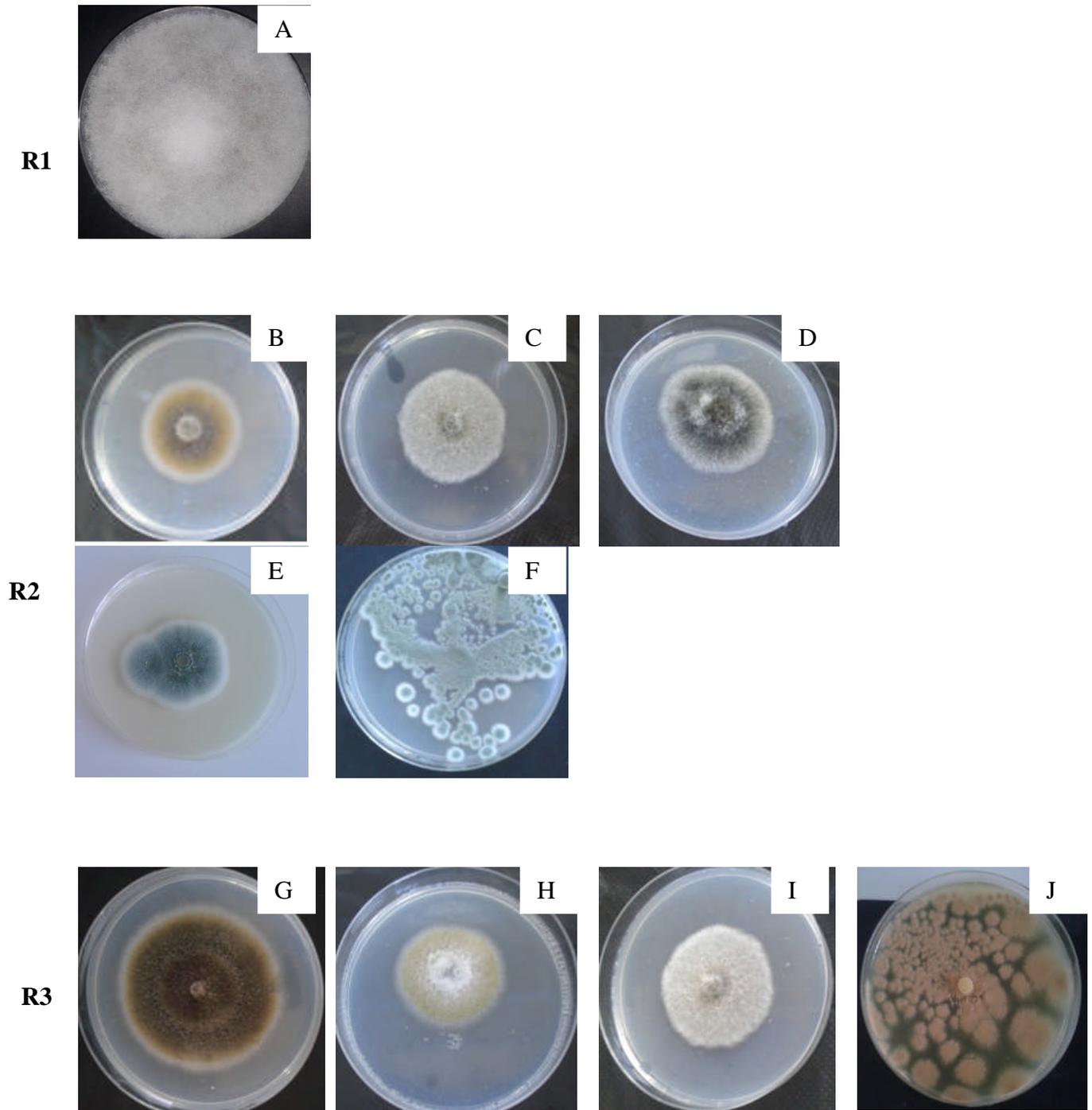
**Figure9** : Résultats d'isolement des moisissures à partir du blé dur

Les résultats obtenus montrent qu'il y a une variation des souches avec différents aspects.

## 4. Résultat

---

### 4.1.2 Purification des souches



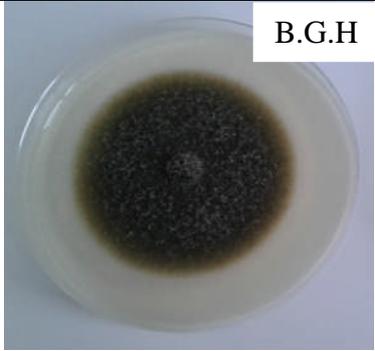
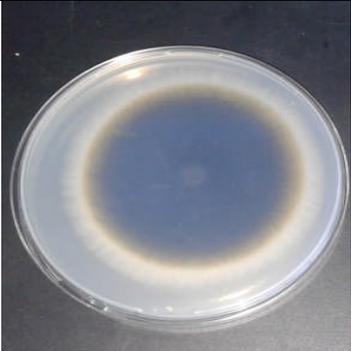
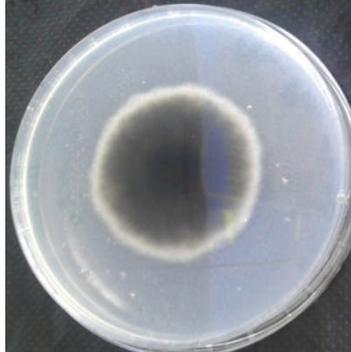
**Figure 10 :** Aspects macroscopiques des isolats purifiés

## 4. Résultat

### 4.1.3 Identification

Pour identifier un champignon, c'est d'abord lui reconnaître l'appartenance à un genre, qui est un groupement d'organismes liés entre eux par des caractères communs (Cahagnier, 1998). Selon Barnett et Hunter (1972) et on se basant sur l'étude des caractères macroscopiques (couleur, aspect de colonie et le revers des boîtes ...) et microscopiques (forme de thalle et des spores...) des souches fongiques isolées, nous avons identifié plusieurs genres sur le milieu PDA :

**Tableau 05** : Aspect macroscopique et microscopique des souches fongiques B ;G ; H ;D ;I et C)

Aspect macroscopique		Aspect microscopique
Surface	Revers	X 40: Bleu de coton (lactophénol)
 <p>B.G.H</p>		
 <p>C.D.I</p>		

#### **Souches (B. G H) : *Alternaria solani***

Cette souche croître rapidement, les colonies de couleur vert, le verso est vert foncé à noir. Sous microscope avec un grossissement x 40 on peut voir des hyphes septés, les conidiophores sont cloisonnée, septés.

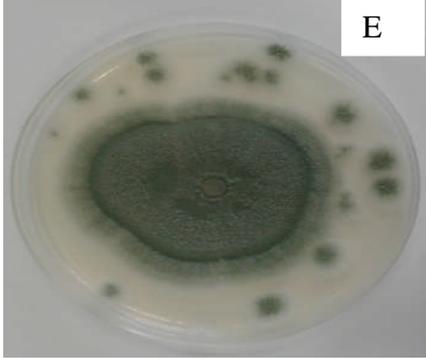
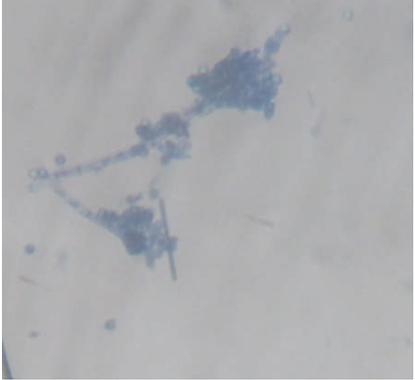
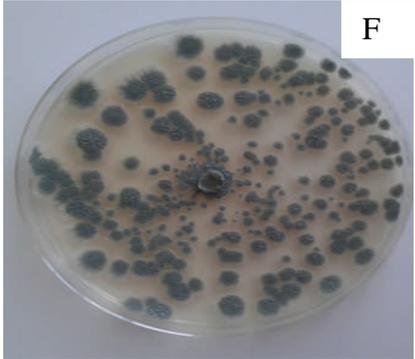
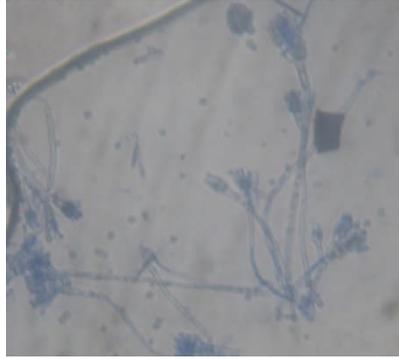
#### **Souches (C. D. I) : *Alternaria alternata***

Cette souche croître rapidement, les colonies de couleur blanc-gris au départ et devient rapidement foncé. Le verso est vert foncé. Sous microscope avec un grossissement x 40 on peut voir des hyphes septés, les conidiophores sont cloisonnées, septés.

## 4. Résultat

Les *Alternaria* sont des saprophytes ou des parasites des plantes très répandus. On les rencontre souvent dans des céréales stockées.

**Tableau06:** Aspects macroscopiques et microscopiques des souches fongiques de Souche E et F

Surface	Revers	Aspect microscopique X 40: Bleu de coton (lactophénol)
 E		
 F		

### **Souche E: *Penicillium sp.1***

Ce champignon pousse doucement sur les milieux utilisés en mycologie, leur croissance est moyenne avec une colonie poudreuse de couleur verte pistache, le revers est blanc.

Sous microscope avec un grossissement x40 on peut voir des hyphes septés porte des conidiophores, les phialides sont disposées en verticille à l'extrémité des conidiophores.

## 4. Résultat

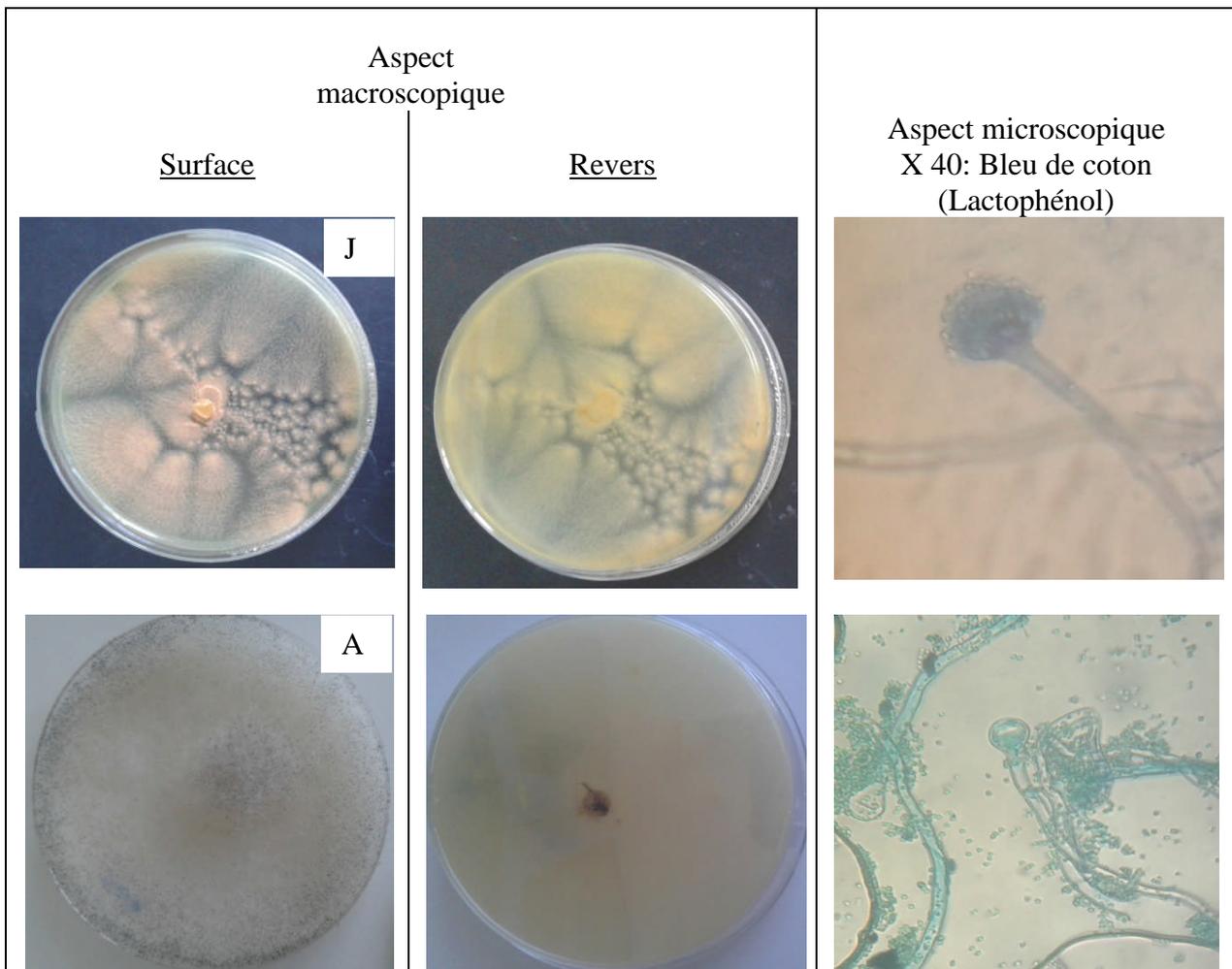
### Souche F: *Penicillium sp. 2*

Ce champignon pousse facilement sur les milieux utilisés en mycologie, leur croissance est rapide avec une colonie poudreuse de couleur verte, le revers est blanc.

Sous microscope avec un grossissement x40 on peut voir des hyphes septés portent des conidiophores, les phialides sont disposées en verticille à l'extrémité des conidiophores.

(Chabasse et al., 2002).

**Tableau07:** Aspects macroscopiques et microscopiques des souches fongiques (souche A et souche J)



### Souche J : *Aspergillus sp.*

La croissance de ce champignon est un peu lente 5 à 7 jours, le recto : des colonies poudreuses blanches à crème, de teinte beige à brun, le verso jaune à brun vert. Sous microscope avec un grossissement X 40 on peut voir des vésicules globuleuses, conidies globuleuses lisse.

## 4. Résultat

---

### Souche A : *Rhisopus* sp.

Les colonies de cette souche à une croissance très rapide et extensive, on une texture cotonneuse avec une couleur blanche. Sous microscope avec un grossissement X 40 on peut voir des filaments large non septés des conidies liber.

### 4.2 Détermination des rendements d'extraction

L'extraction de la plante a permis d'obtenir quatre extraits bruts: l'extrait méthanolique feuille (EMF), l'extrait méthanolique tige (EMT), l'extrait aqueux feuille (EAF) et l'extrait aqueux tige (EAT).

Le rendement d'extraction ont été déterminés par la formule suivante :

$$R\% = \frac{\text{Masse de résidu d'extrait}}{\text{Masse de la poudre végétale}} \times 100$$

Pour chaque échantillon, nous avons calculé le rendement de l'extraction, les résultats obtenus sont présentes dans le tableau suivant :

**Tableau 08:** Couleur et rendement des différents extraits de *Calycotome spinosa*

Extrait	Couleur	Rendement %
EAF	Verte	12,2
EAT	Marron	7,41
EMF	Verte foncé	13
EMT	Marron foncé	7 ,167

Les résultats obtenus montrent que parmi les différents extraits de la plante, l'extrait EMF représente le rendement le plus élevé (13%), suivi par l'extrait EAF (12,2%), puis l'extrait EAT (7,41 %), et a la fin l'extrait EMT (7 ,167 %) qui possède le plus faible rendement.

De plus, les extraits obtenus ont été caractérisés par des couleurs et des aspects différents (**Tableau03**).

## 4. Résultat

### 4.3 Activité antimicrobienne des extraits

#### 4.3.1 Activité antifongique

##### 4.3.1.1 Tri des souches testées

Un classement préliminaire par groupe de souches présentant les mêmes caractéristiques: aspect morphologique du mycélium, couleur de thalle et vitesse de croissance a été réalisé.

Ensuite six souches ont été sélectionnées pour les tests antifongiques (tableau 08) qui sont des espèces causant la détérioration des céréales ou provoquant des risques sanitaires (la sécrétion des mycotoxines) ou les deux.

**Tableau09:** Souches testées

Code de la souche	Genre (Espèce)
CDI	<i>Alternaria alternata</i>
BGH	<i>Alternaria solani</i>
E	<i>Penicillium sp. 1</i>
F	<i>Penicillium sp. 2</i>
J	<i>Aspergillus sp.</i>
A	<i>Rhizopus sp.</i>

##### 4.3.1.2 Taux d'inhibition de la croissance mycélienne

L'effet des extraits aqueux et méthanoliques des feuilles et des tiges de *C. spinosa* sur la croissance mycélienne des souches comparativement au témoin est traduit par une diminution de la croissance mycélienne et une modification de l'aspect macroscopique en fonction du temps et de la concentration des extraits.

**Tableau 10:** Taux d'inhibition des moisissures

Moisissure	PI (%)			
	EAF	EMF	EAT	EMT
<i>Alternaria alternata</i>	30,55	43,05	54,16	29 ,86
<i>Alternaria solani</i>	30,55	48,59	51,41	42,95
<i>Penicillium sp1</i>	43,05	44,44	37,5	40,27
<i>Penicillium sp2</i>	/	/	/	/
<i>Aspergillus sp</i>	/	20,58	/	/
<i>Rhizopus</i>	/	/	/	/

#### 4. Résultat

---

Dans les boîtes témoins, le mycélium a atteint la périphérie de la boîte de Pétri le 4<sup>ème</sup> à 8<sup>ème</sup> jour d'incubation.

On remarque que les souches les plus inhibées par les quatre extraits sont *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Penicillium sp1*. le taux d'inhibition le plus élevé est montré par l' EAT sur *Alternaria solani* et *Alternaria alternata* (51-54% successivement), par contre le taux d'inhibition le plus faible est marqué par EMT de 20.58% contre les *Aspergillus sp*.

Les résultats de l'activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux des feuilles et des tiges de *C. spinosa in vitro* sur les souches fongiques isolées sont représentés dans le tableau

#### 4. Résultat

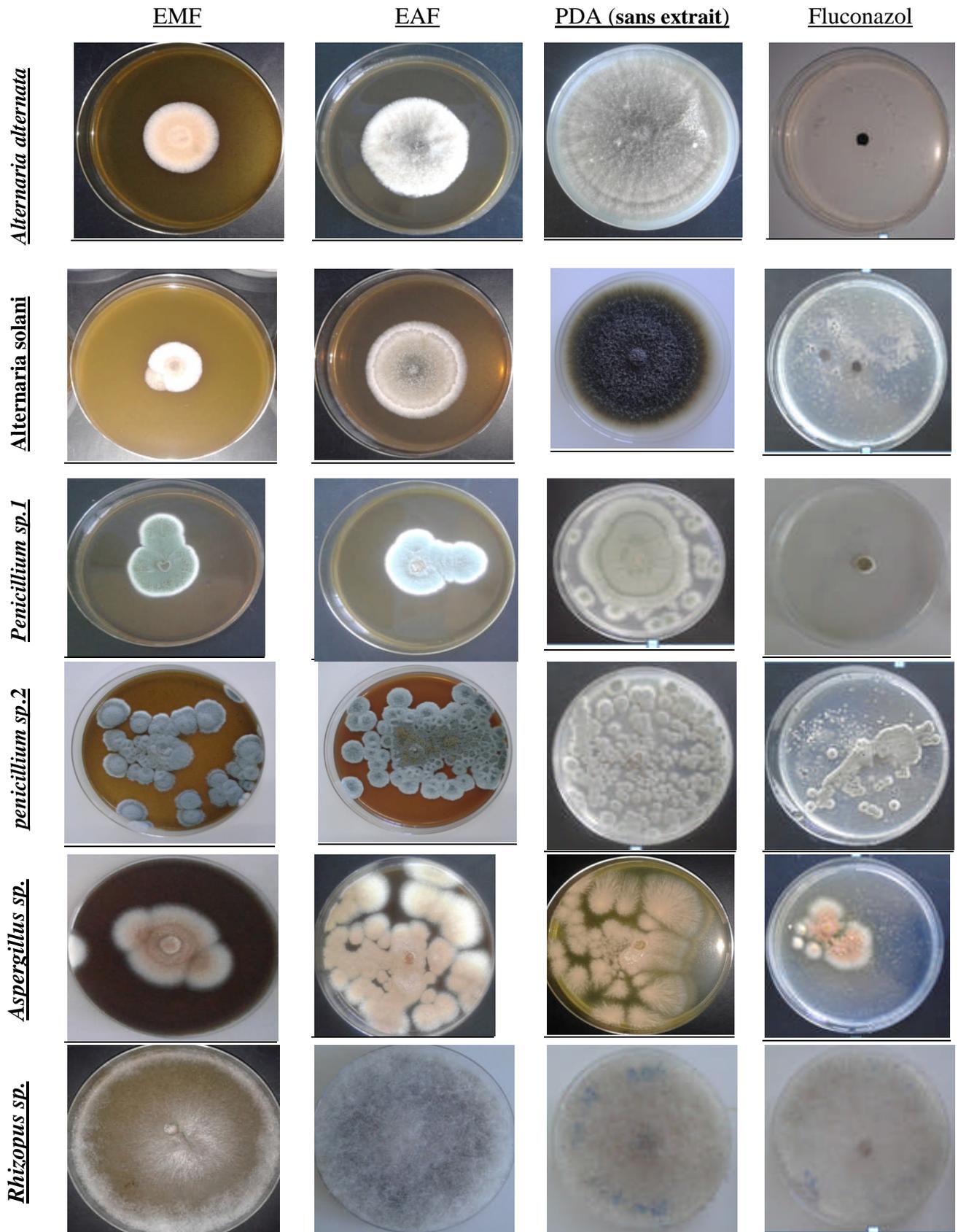


Figure 11: Activité antifongique des extraits EMF et EAF sur les isolats fongiques

## 4. Résultat

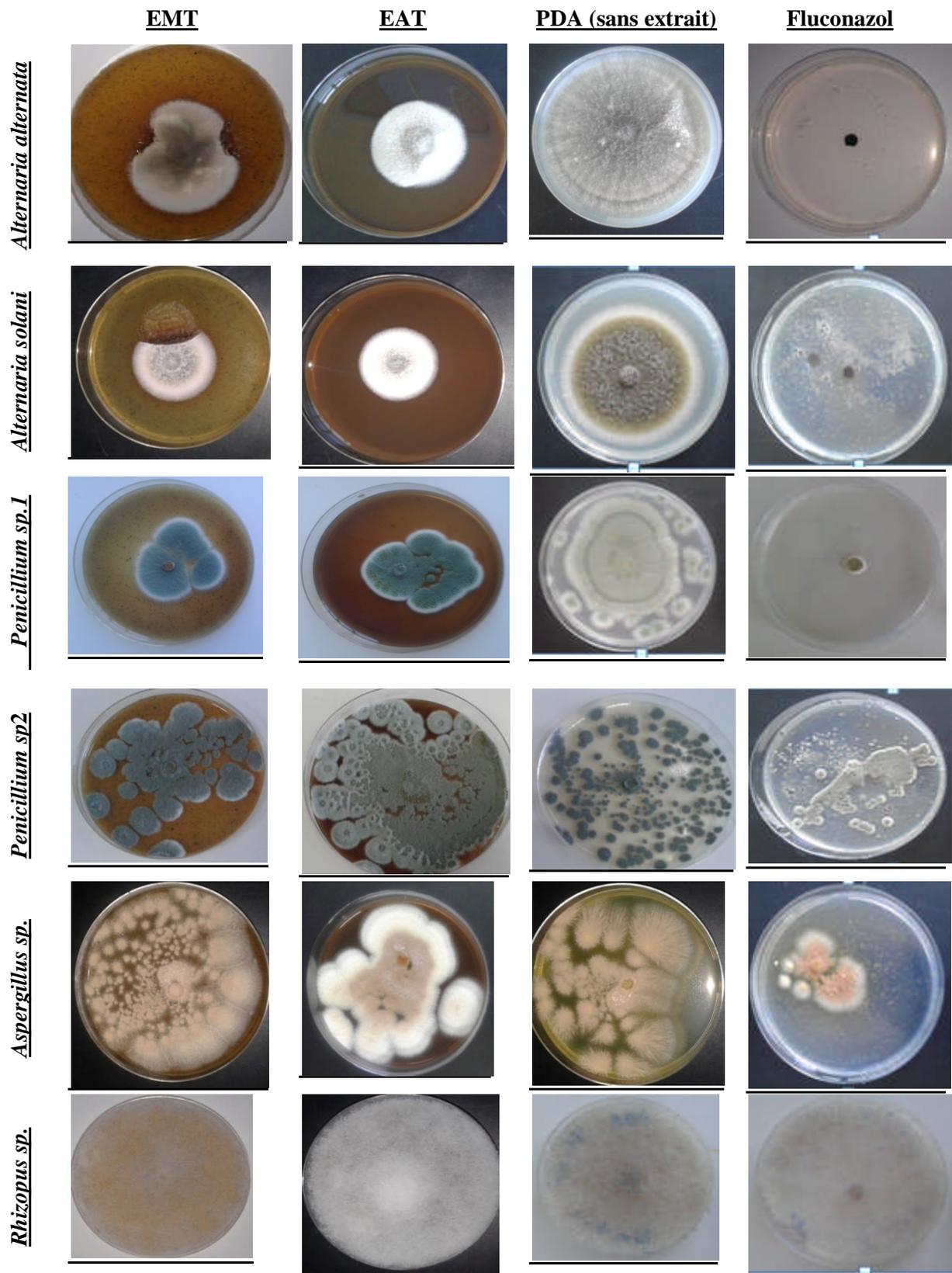


Figure 12: Activité antifongique des extraits EAT et EMT sur les isolats fongiques

## 4. Résultat

Les souches représentent différents aspects et différentes couleurs à chaque fois en change l'extrait.

### 4.3.2 Activité antibactérienne

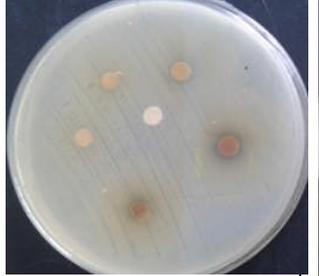
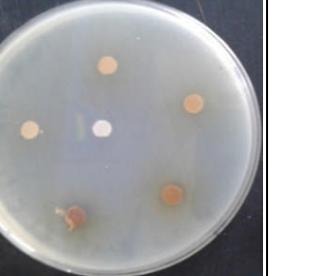
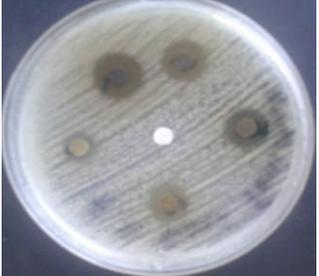
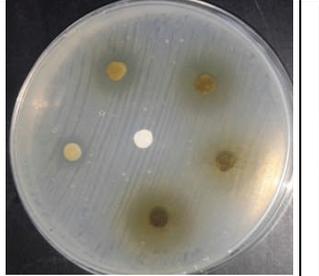
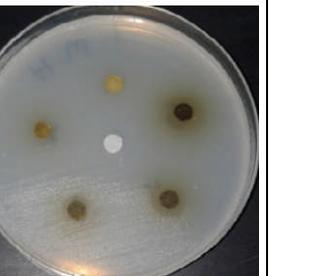
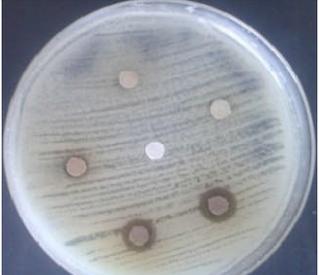
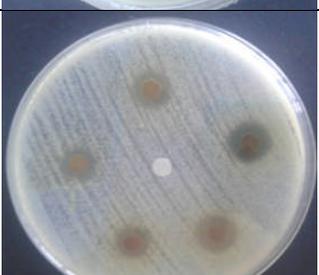
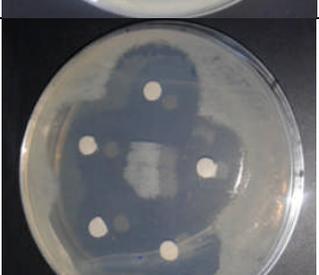
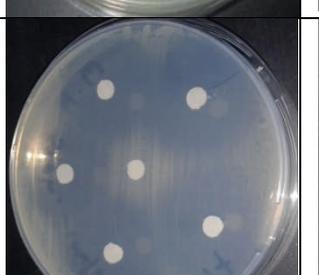
L'activité antibactérienne se traduit par l'apparition d'une zone d'inhibition autour du disque de papier imprégné d'extrait brut étudié.

Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. Par ailleurs des bactéries étudiées.

**Tableau11** : Zone d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits sur les bactéries à Gram positif

			Zone d'inhibition (mm)		
Extrait	[C]mg/ml	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus sp</i>	
Feuilles	EAF	25	/	/	/
		50	/	/	/
		100	7	/	/
		150	10	/	/
		200	11	/	/
	EMF	25	10	10	/
		50	11	13	/
		100	12	16	/
		150	15	18	/
		200	16	20	/
Tiges	EAT	25	/	/	/
		50	/	/	/
		100	8	/	/
		150	10	/	/
		200	11	/	/
	EMT	25	9	6	/
		50	9	9	/
		100	13	10	/
		150	15	13	/
		200	16	15	/
DMSO (20 µl)		/	/	/	
chloramphénicol 30µg (Control+)		35	32	33	

#### 4. Résultat

Souche Extraits		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> sp
Feuilles	EAF			
	EMF			
Tiges	EAT			
	EMT			
Chloramphénico 1 30µg (control+)				

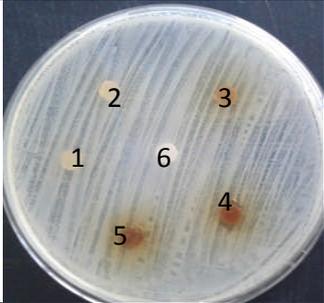
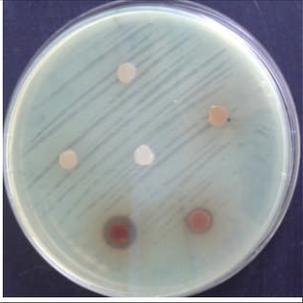
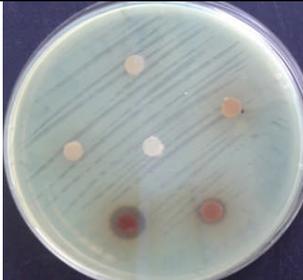
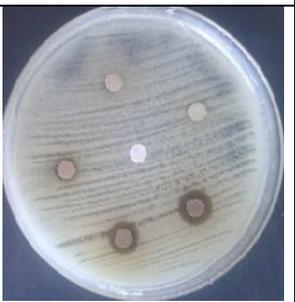
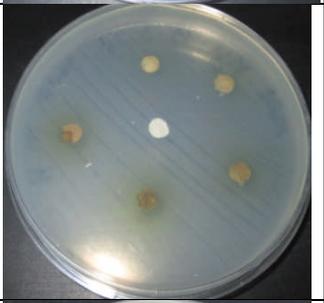
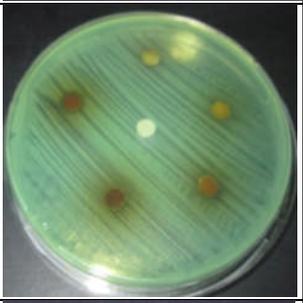
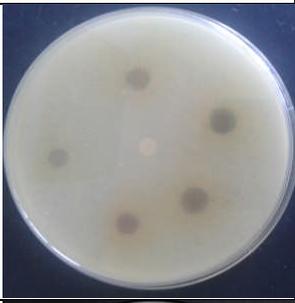
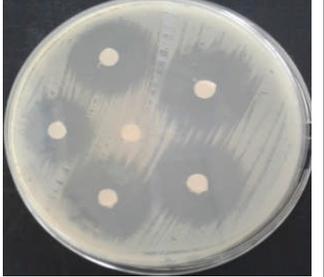
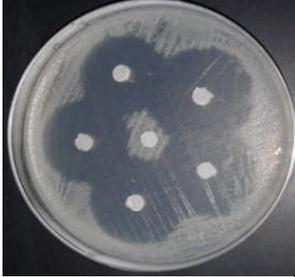
**Figure13** : Zone d'inhibition de l'activité antibactérienne des bactéries gram positif

#### 4. Résultat

**Tableau 12 :** Zone d'inhibition de l'activité antibactérienne des extraits sur les bactéries à Gram négatif

souches extraits		[C] mg/ml	Zone d'inhibition (mm)		
			<i>Klebseilla</i> sp	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. abony</i>
Feuilles	EAF	25	/	/	/
		50	/	/	/
		100	/	/	/
		150	/	8	10
		200	/	10	10
	EMF	25	/	/	7
		50	/	/	8
		100	/	/	10
		150	/	/	12
		200	/	/	12
Tiges	EAT	25	/	/	/
		50	/	/	/
		100	/	/	7
		150	/	7	8
		200	/	10	10
	EMT	25	/	/	/
		50	/	/	7
		100	/	/	7
		150	/	/	7
		200	/	/	8
DMSO			/	/	/
Chloramphénicol 30µg (control+)			35	32	33

#### 4. Résultat

souches		<i>Klebseilla sp</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S.abony</i>
Feuilles	EAF			
	EMF			
Tiges	EAT			
	EMT			
Chloramphénicol 30µg (Control+)				

**Figure14** : Zone d'inhibition de l'activité antibactérienne des bactéries gram négatif, 1 : 25 mg /ml, 2 :50mg/ml, 3 :100mg/ml , 4 : 150 mg/ml 5 : 200mg/ml, 6 :DMSO

## 4. Résultat

Les résultats obtenus dans les tableaux 5,6 et les figures 14,15 ont révélé que les quatre extraits (200 mg/ml) peuvent être divisés en trois groupes en fonction de la zone d'inhibition (mm) :

- **Des extraits à fort effet antibactérien** : le diamètre de la zone d'inhibition sur les bactéries est : à l'intervalle de 14 à 20 mm. Et donc, la souche test est sensible aux extraits. Il s'agit les extraits EMF et EMT sur les deux bactéries à Gram + : *B. subtilis* et *S. aureus*.

- **Des extraits à effet moyen** : le diamètre de la zone d'inhibition sur les bactéries est : à l'intervalle de 10 à 14 mm. Il s'agit les extraits EAF et EAT sur les trois bactéries : *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *S. abony*.

- **Des extraits à effet nulle** : le diamètre de la zone d'inhibition sur les bactéries est égal ou inférieur à 7 mm. Il s'agit les quatre extraits EAF, EMF, EAT et EMT sur les bactéries : *Streptococcus sp.* et *Klebsiella sp.*

On constate qu'il ya des extraits inhibent la croissance de certaines bactéries que d'autres par exemple *Pseudomonas* a été seulement inhibé par EAT et EAF.

On remarque que les deux bactéries *Streptococcus sp.* et *Klebsiella sp.* ne présentent aucune sensibilité aux quatre extraits.

### 4.3.2 Concentration minimal inhibitrice(CMI)

**Tableau 13** : Concentration minimal inhibitrice des quatre extraits

		CMI (mg/ml)					
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus</i> sp	<i>Klebsiella</i> sp	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S.abony</i>
Extraits	EAF	100	/	/	/	150	150
	EMF	25	25	/	/	/	25
	EAT	100	/	/	/	150	100
	EMT	25	25	/	/	/	50

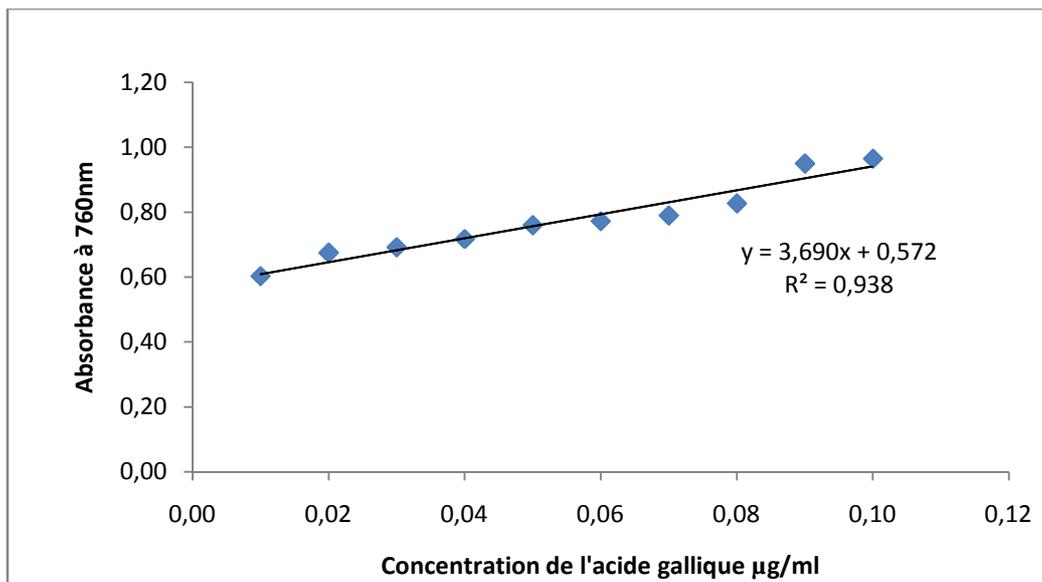
La C.M.I se trouve entre 25 et 150 mg/ml de MH.

## 4. Résultat

Les analyses des résultats des CMI montrent que les extraits de *C.spinosa* présentent une activité antibactérienne remarquable. En effet, pour les six souches étudiées, la gamme des CMI de nos extraits est varié entre les bactéries. *B. subtilis* EMF(100), EAT (25), EMT (100), EAF ( 25mg/ ml) , et *S. aureus* sont sensibles que pour deux extraits EMF (25), EMT (25 mg/ ml ). Ce qui concerne *P. aeruginosa* EAF (150), EAT (150 mg/ ml). *S.abony* est sensibles aux quatre extraits EAF (150) EMF (25), EAT (100), EMT (50 mg/ ml). Selon les tableaux et les figures, on remarque que l'extrait méthanolique des feuilles de *C. spinosa* possède une très bonne activité sur *S. aureus* et *B. subtilis* semblent être les plus sensibles suivi de *S. abony* avec une CMI=25 mg/ml. *Streptococcus* sp *Klebseilla* sp pas de CMI

### 4.4 Dosage des composés phénoliques totaux

La quantification des composés phénoliques a été faite en fonction d'une courbe d'étalonnage linéaire ( $y= ax+b$ ) réalisé par une solution étalon (l'acide gallique) à différentes concentrations.



**Figure 15:** Courbe d'étalonnage de l'acide gallique

Les polyphénols totaux ont été déterminés par la méthode de Folin-Ciocalteu. L'acide gallique a été utilisé comme standard et l'absorbance a été lue dans une longueur d'onde de 765 nm.

Les résultats obtenus sont représentés dans une courbe d'étalonnage, ayant l'équation:

$$y = 3,690x + 0,572$$

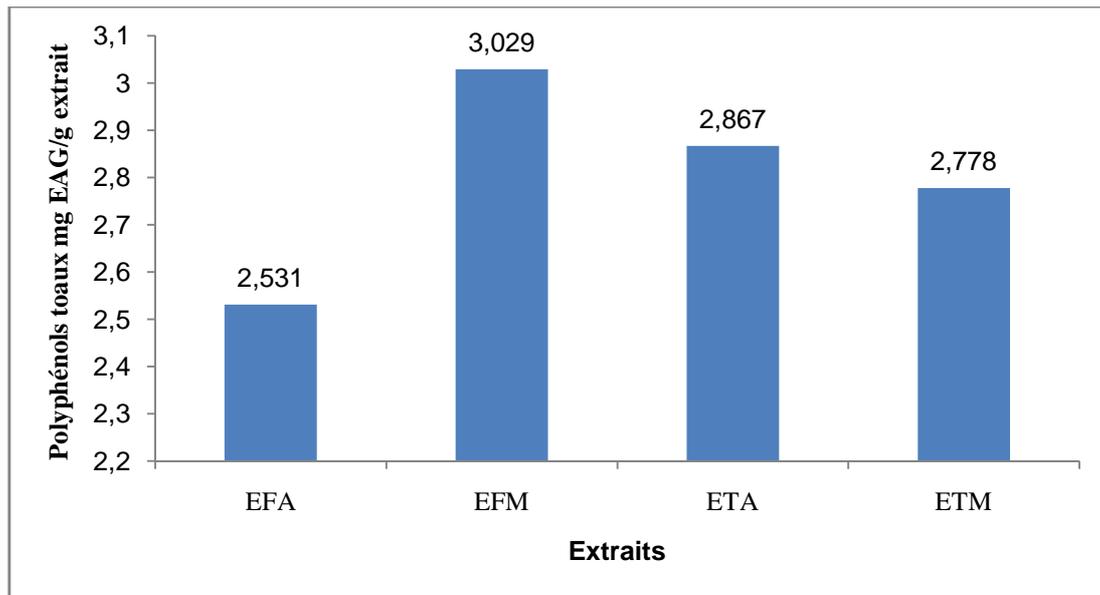
$$R^2 = 0,938$$

#### 4. Résultat

---

La relation entre la concentration et l'absorbance est proportionnelle donc la loi de **Beer Lambert** est vérifiée dans la gamme des concentrations utilisées.

La teneur en composés phénoliques de chaque extrait a été alors calculée à partir de la courbe d'étalonnage et exprimée en milligrammes équivalent en acide gallique par gramme de la matière sèche, la mesure de la densité optique a été effectuée à la longueur d'onde de 765nm. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant :



**Figure16** : Histogramme représente les polyphénols totaux des quatre extraits

On remarque d'après les résultats du tableau ci-dessus que la quantité des composés phénoliques varie entre 3,029 et 2,531 mg/g mg EAG/g d'extrait. Le taux des composés phénolique le plus élevé a été détecté dans l'extrait méthanolique des feuilles 3,029 mg/g mg EAG/g d'extrait.

# Discussion

## 5. Discussion

---

### 5. Discussion

Le parcours vers des nouvelles substances naturelles comme des alternatives d'agents chimiques reste une solution prometteuse. Les résultats obtenus des rendements des extraits des feuilles et des tiges de *C. spinosa* sont plus élevés chez les extraits méthanolique que aqueux pour les deux parties de la plante (l'EMF 13 %, suivi de l'EAF 12,2% ; l'EMT 7,167% est plus élevé que l'EAT 7,41%).

Autre étude de **Yekhlef (2010)** a obtenue des résultats similaires avec nos résultats. L'extrait méthanolique de *Laurus nobilis* représente le rendement le plus élevé (21.94 %) suivi de l'extrait aqueux de *Laurus nobilis* (20.05 %).

En revanche, d'autre étude reporte que le rendement de l'EM et l'EA de la fleur de *Capparis spinosa* est presque le même (21.58 ; 21.48 % successivement) (**Meddour, 2011**).

Dans une étude réalisée par **Benammar et al. (2008)** sur *Rhamnus alaternus L.* originaire de la Tunisie, des résultats similaires ont été trouvés. Les rendements des extraits méthanoliques des feuilles et des tiges de la plante étudiée (10 et 11 %) sont supérieurs par rapport aux extraits aqueux (6 et 8 %).

la différence du rendement est probablement due à la période de prélèvement, facteurs climatiques et géologiques.

Les céréales sont à la base de l'alimentation humaine, leur détérioration présente un danger menaçant la nutrition des hommes et des animaux domestiques.

Les grains de céréales forment un excellent substrat pour les moisissures (**Mills, 1990**).

Malgré l'apparence saine des grains testés, ils sont révélés contaminés. Cette contamination est due à la charge initiale en spores qui après incubation trouvent le milieu favorable pour leur germination et la formation des mycéliums (**Tahani et al., 2008**). La faible densité fongique au niveau des grains désinfectés pourrait s'expliquer par l'effet fongicide et fongistatique du désinfectant utilisé (**Guiraud, 2003**). Ce dernier n'a aucun effet sur les souches dites internes ou profondes des grains.

A partir des graines de blé dur stocké analysées, la richesse par une charge mycologique a été révélée de l'ordre de quatre genres dont les 17 isolats, la moyenne totale des grains de blé

## 5. Discussion

---

contaminés est d'environ 90%. Alors que les espèces isolées sont *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Penicillium sp.1*, *Penicillium sp2*, *Aspergillus sp.* et *Rhizopus sp.*

Nos résultats montrent que le taux de contamination du blé par les *Alternaria* est le plus élevé, suivi de celui des *Penicillium*. Comparativement avec les études de **Benmansour- Brixi (2005)**, le taux de contamination de l'espèce *Aspergillus figer* est le plus dominant.

De plus **Skrinjar et al.(1992)** et **Gonzalez et al. (1995)** ont rapportés que les *Penicillium spp.* ont été les plus fréquemment isolés à partir du maïs stocké. Cette différence peut être expliquée par la durée de stockage, l'origine des grains et la période de prélèvement.

Il est aussi noté que les espèces les plus dominantes dans nos échantillons de blé dur sont les *Alternaria* ( 76,47 %) et *Penicillium* (11,76 %). Ces genres constituent la flore essentielle du stockage car ils tolèrent l'humidité la plus faibles (**Lacey et Magan, 1988 ; Godon et Loisel ,1997 ; Adebajo et Bankole 2003**). Par conséquent, ils sont responsables de la plupart des accidents de conservation d'origine microbiologique pour les produits considérés (**Godon et Loisel, 1997**).

D'autres études sur la flore fongique des légumineuses ont montré que les mycètes de stockage des haricots (*Phaseolus vulgaris*) en Inde a inclut *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Rhizoctonia*, *Stemphylium* et *Trichoderma* (**Sud et al., 2005**). Les espèces de *Penicillium* et *Eurotium* étaient communes pour les haricots Taiwanais, mais, dans les haricots Canadiens, les mycètes répandues étaient *Alternaria*, *Fusarium* et *Rhizoctonia* (**Tseng et al., 1995**).

Les plantes contiennent de nombreux composés doués d'une action antimicrobienne, ces constituants comprennent les composés phénoliques, (**Rojas et al., 1992**), le pouvoir antimicrobien des extraits de plantes est tributaire de leurs compositions chimiques.

Le test de l'activité antimicrobienne des différents extraits des feuilles et des tiges de la plante *C. spinosa* (méthanolique et aqueux) a été effectué sur six bactéries. Ce test a été évalué à l'aide d'une méthode de diffusion de disque en mesurant les diamètres de la zone d'inhibition (**Sokmen et al., 2004**).

Nos résultats ont montré que l'extrait méthanolique de feuilles (EMF) était le plus actif (à 200 mg/ml) contre *B.subtilis*, *S.aureus* et *s.abony* (15, 20 et 12mm respectivement), mais il ne

## 5. Discussion

---

présentait aucune activité contre *Streptococcus sp.*, *Klebsiella sp.* Et *P.aeruginosa*. Comparativement à une étude de **Meddour (2011)**, l'extrait méthanolique des fleurs du *Capparis spinosa* est inactif sur *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

Pour l'extrait aqueux de feuilles, une activité moins importante a été observée contre les différentes souches bactériennes: *Bacillus sp.*, *S. abony* et *P. aeruginosa*. (11,10 et 10 mm successivement). En revanche, **Meddour (2011)** a signalé que l'extrait aqueux de la fleur a une activité sur *S. aureus*. La zone d'inhibition est de 9,50 mm et inactif sur *P. aeruginosa*. Ce dernier résultat est similaire avec celle de notre extrait aqueux tige.

D'autre part, les différents extraits de tiges (aqueux et méthanolique) ont révélé une activité moins importante que les feuilles. L'EAT a une activité contre *B. subtilis*, *P. aeruginosa* et *S. abony* (11, 10 et 10 mm successivement), et aucune activité du même extrait n'a été observée contre *S. aureus*, *Streptococcus sp.* et *Klebsiella sp.*

Une étude de **Loy et al. (2001)** a montré que l'extrait brut d'huile essentielle et de méthanol des feuilles de *Calycotome villosa* ont un potentiel très toxique et très actif contre plusieurs bactéries (en particulier *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (20 mm et 10 mm respectivement), *Bacillus lentus* B 60 (respectivement 10 et 11 mm), *E. coli* ATCC 25922 (15 et 10 mm) et *Klebsiella pneumoniae* 52 (12 et 10 mm).

Les résultats du dépistage antimicrobien d'extraits bruts hydrométhanoliques de 20 espèces de plantes algériennes contre quatre espèces de bactéries (*B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* et *P. aeruginosa*) ont montré que tous les extraits testés ont révélé une activité antimicrobienne montrant une sélectivité différente pour chaque microorganisme (**Krimat et al., 2014**).

**Naili et al (2010)**, ont étudié l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique des feuilles d'*Artemisia. campestris*. Ils ont utilisé plusieurs souches dont *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*. Les résultats obtenus dans cette étude ont montré que cet extrait possède un effet inhibiteur sur toutes les bactéries étudiées.

Notre étude a affirmé que les bactéries Gram + sont plus sensibles que les bactéries Gram- . Les mêmes résultats sont confirmés par de nombreuses expériences (**Cosentino et Tuberoso, 1999 ; De-Billerbeck, 2002**) ayant montré que les bactéries à Gram- sont plus résistantes aux extraits végétaux que les bactéries à Gram+.

## 5. Discussion

---

Par contre **Zaika (1988)** et **Ali Shtayeh et al., (1988)** ont affirmé que les bactéries à Gram+ sont plus résistantes aux extraits végétaux que les bactéries à Gram-.

Ces affirmations n'ont cependant pas été confirmées par d'autres travaux, la susceptibilité des bactéries est en effet indépendante du Gram (**Dorman et Deans, 2000**), et on dépend des extraits utilisées (**Dean et Ritchie, 1987**). Nos résultats pour les autres espèces (*E. coli*, *S. aureus* et *S. blanc*) corroborent cette dernière affirmation.

La concentration minimale inhibitrice est définie comme étant la concentration la plus basse rapportée pour donner une inhibition complète des bactéries testées après 24 heures d'incubation (**Wan et al., 1998 ; Canillac et Mourey, 2001**).

En effet, pour les six souches étudiées, la gamme des CMI de nos extraits est variée de 25 à 150 mg/ml. On a constaté que la CMI la plus faible (25mg/ml) a été montrée par les deux extraits méthanolique contre les bactéries à Gram positif : *B. subtilis* et *S. aureus*. Tandis que la CMI la plus élevée (150mg/ml) a été notée par les deux extraits aqueux sur *P. aeruginosa*.

En revanche l'étude de **Harrar (2012)** sur *Rhamnus alaternus L* ; les concentrations minimales inhibitrices (CMI) exprimées par l'extrait méthanolique des racines sur les souches testées ont été de 6,25 mg/ml pour *E.coli*, *S.aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis* et 0,2 mg/ml pour *P.aeruginosa*.

**Benammar et al. (2008)** ont trouvés des valeurs de CMI d'extrait méthanolique de *Rhamnus alaternus* tunisienne supérieurs à 6 mg/ml avec les souches de *E.coli*, *S.aureus* et *E. faecalis*.

La recherche des effets antifongiques sur les souches rencontrées dans le blé dure stockés a révélé une efficacité des extraits aqueux et méthanolique des feuilles et des tiges de cette plante sur la majorité des souches fongiques isolées, ce qui confirme que les substances bioactives des plantes sont considérées comme des composés non phytotoxiques et potentiellement efficaces contre les champignons pathogènes **Chang et al., (2008)**. Le développement de la sécurité des agents antifongiques pour le contrôle des phytopathogènes dans l'agriculture connaît une place importante dans la recherche (**Field et al., 2006; Lee, 2007**).

Concernant le pouvoir antifongique, les résultats obtenus montrent que les moisissures les plus sensibles pour les quatre extraits de la plante étudiée (*C. spinosa*) à une concentration de 20mg/ml en PDA sont *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* et *Penicillium sp.1*. En

## 5. Discussion

---

revanche, aucune activité antifongique n'a été signalée par ces quatre extraits contre les espèces fongiques suivantes : *Penicillium sp.2*, *Aspergillus sp.* et *Rhizopus sp.*

D'après **Kandil et al. (1994)**, l'huile essentielle de *T capitatus* est plus active sur les *Penicillium spp* suivi par les *A. figer* et *A.flavus* à des concentrations de 10 à 200 mg/ml.

En outre, **Solinas et al. (1981) in Kandil et al. (1994)** ont mentionné que les principaux constituants biologiquement actifs sont des composés phénoliques en particuliers le carvacrol (91%) et le thymol (9%).

**Didry et al. (1993) in Belhattab et al. (2004)**, ont trouvé un effet antifongique fort de carvacrol qui est le composé majoritaire des plantes d'origan. D'autres composés phénoliques peuvent être majoritaires, tel que le groupe carvacrol et/ou thymol (**Ruberto et al., 2002**).

Les *Alternaria* et *Penicillium sp.2* semblent être plus sensibles pour les extraits aqueux et méthanolique des feuilles et des tiges de *C. spinosa* et l'inverse pour les autres souches.

La variabilité des résultats est due à l'influence de plusieurs facteurs tels que la méthodologie, les micro-organismes testés et les extraits utilisées (**Pattnaik et al., 1996**).

Des modifications morphologiques (déchirures mycéliens, ... ) ont été observés sur les moisissures sensibles. Ces observations étaient confirmées par les travaux de **De Billerbeck (2000)** sur le mycélium d'*A. figer* sous l'effet des vapeurs d'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* (L.).

La présente expérimentation révèle que l'EAT de *Calycotome spinosa* possède un effet plus antagoniste que les autres extraits 54% pour *alternaria alternata* En effet, l'EMF a démontré un remarquable effet fongistatique contre *Aspergillus sp*, *Alternaria alternata*, *Alternaria solani* et *Penicillium sp1* avec des PI% : 20.58, 43.05, 48.59 et 44.44% successivement, ce dernier est expliqué par la diminution de la croissance fongique après le repiquage des disques dans les milieux PDA seul.

Toutefois, *Penicillium sp2* et *Rhizopus sp.* ont montré une résistance contre tous les extraits de la plante.

D'après **Gacem (2011)**, l'activité antifongique des extraits des graines de *Citrullus colocynthis* ont révélées que les deux extraits méthanoliques et aqueux possèdent une remarquable activité antifongique liée à leur richesse en composés bioactifs largement

## 5. Discussion

---

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*.

L'étude quantitative des polyphénols des extraits bruts des feuilles et des tiges de *Calycotome spinosa*, au moyen des dosages spectrophotométriques, avait pour objectif la détermination de la teneur des polyphénols totaux.

La raison principale pour le choix de ces substances réside dans le fait que la majorité des propriétés antimicrobiennes et anti-oxydantes des plantes médicinales est due aux polyphénols.

Les polyphénols sont estimés par plusieurs méthodes, mais la plus utilisée est celle de Folin-Ciocalteu (**Li et al., 2007**).

En ce qui concerne le dosage des polyphénols totaux, les résultats montrent que l'extrait méthanolique des feuilles représente l'extrait le plus riche avec: 3,029 mg EAG /g d'extrait, suivi de l'extrait aqueux tiges 2,867mg EAG /g d'extrait, en suite l'extrait aqueux feuilles présente 2,531 mg EAG/g d'extrait, L'extrait méthanolique tiges avec 2,778mg EAG /g d'extrait représente la fraction qui contient la plus faible teneur en polyphénols.

Il est bien connu que la quantité de composés phénoliques varie en fonction des familles et des variétés (**Sini et al., 2010; Belmekki et al., 2012**).

Cette différence dans les teneurs peut être aussi expliquée par les conditions environnementales, climatiques et période de collecte ainsi que par les facteurs génétiques et les conditions Expérimentales.

**Meddour (2011)** a encore trouvé que la teneur des polyphénols totaux d'extrait méthanolique des fleurs de la plante *Capparis spinosa* (29,01 mg EAG /g) est plus élevée que l'extrait aqueux (25,68 mgEAG /g).

En outre, **Bonina et al., (2002)** ont également trouvé que l'extrait méthanolique lyophilisé du *C. spinosa* est riche en polyphénols ( $65,13 \pm 5,53$  mg/g milligramme d'équivalent de rutine par gramme d'extrait), valeur élevée par rapport au résultat de ce travail. Cette différence trouve son explication dans la différence des parties de la plante étudiées et probablement dans la différence en standard utilisé pour le dosage des polyphénols.

L'étude de (**Harrar, 2012**) sur *Rhamnus alaternus* L. est similaire avec nos résultats ce qui concerne les tiges. Les teneurs en polyphénols totaux des extraits méthanolique EMTF et EMR

## 5. Discussion

---

sont 7 mg EAC/g de matière fraîche, relativement faibles par rapport aux extraits aqueux 19 et 36 mg EAC/g de matière fraîche pour EAR et EATF respectivement.

Nos résultats en conséquence ressemblent à ceux trouvés par **Benammar et al. (2008)** sur *Rhamnus alaternus* L. En effet, ils ont déterminé une teneur de 13 mg EAG/ g d'un extrait méthanolique suivi aussi par une extraction dans le butanol saturé en eau des feuilles.

# **Conclusion et perspective**

## 6.conclusion et perspective

### 6. Conclusion et perspectives

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antifongique des extraits méthanolique et aqueux des feuilles et des tiges de *Calycotome spinosa* contre la croissance mycélienne des moisissures isolées a partir de blé dur stocké.

La préparation des extraits aqueux et méthanolique de *C. spinosa* a été réalisée suivant une macération. Le plus fort rendement a été obtenue par l'EMF 13 % suivi par l'EAF 12,2% et l'EAT (7,41 %). l'EMT a donné le plus faible rendement avec (7 ,167%).

D'autre part, pour l'étude microbiologique, la méthode de diffusion donne très bons résultats et montre que quatre bactéries testés sont sensibles (*B. subtilis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *S.abony*) et deux sont résistantes (*Streptococcus* sp, *Klebseilla* sp) aux extraits de *C. spinosa* donnant ainsi des zones d'inhibitions. Chacune de ces bactéries sensibles est caractérisée par une CMI d'extrait végétale propre à elle.

Pour l'activité antifongique, les résultats obtenues ont montré que quatre espèces (*Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Penicillium sp1*, *Aspergillus sp*) sont sensibles et deux sont résistantes (*Rhizopus*, *Penicillium sp2*) aux extraits de *C. spinosa* donnants ainsi une diminution de croissance mycélienne.

D'une façon générale, la plus part de nos extraits ont une activité antimicrobienne qui varie d'une souche a une autre. Cette activité peut être importante ou faible selon la partie de la plante utilisée, la concentration de nos extraits et la souche testée.

On peut conclure que, au bout de cette étude, nous retiendrons que les extraits biologiques de notre plante exercent un effet très pertinent sur les souches étudiées et pourrait par conséquent être utilisée dans le traitement des maladies infectieuses.

## Références bibliographiques

- Adesokan A. A., Akanji m.A., and Yakubu M.T. (2007). Antibacterial potentials of aqueous extract of *Enantia chlorantha* stem bark. African Journal of Biotechnology. 6 (22), p. 2502 - 2505.
- Akinsanmi O.A., Mitter V., Simpfendorfer S., Backhouse E D. et Chakraborty S. (2004). Identity and pathogenicity of *Fusarium spp* isolated from wheat fields in Queensland and northern New South Wales. Australian Journal of Agricultural Research 55, 97-107.
- Bahorun T., Gressier B., Trotin F., Brunet C., Dine T., Luyckx M., Vasseur J., Cazin M., Cazin J. C. and Pinkas M. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arznei. Forschung.*(1996). 46:1086-1089.
- Barry a L. and Thornsberry C. (1985). Susceptibility test, diffusion test procedure, American Journal of Clinical Pathology, 19, p. 492 - 500.
- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris T.C., and Truck M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method, American Journal of Clinical Pathology, 45, p. 493 - 496.
- Bauer, J. & Gareis, M.( 1987). Ochratoxin A in der Nahrungsmittelkette. *Journal of Veterinary Medicine* 34, 613p.
- Bautista-Baños S, Barrera-Necha LL, Bravo-Luna I, Bermudes-Torres L. (2002). Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporoides* of papaya and mango fruit after storage. *Rev Mex Fitopatol* 20:8-12
- 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.
- Belaid D.(1996). Aspect de la céréaliculture, Algérien. *Office des publications universitaires. Alger.* 208p.
- Belhattab R., Larous L., Kalantzakis G., Boskou D. and Exarchou V. (2004). Antifungal properties of *Origanwn glandulosum* Desf. Extracts. *Food, Agriculture & Environment* Vol.2 (1), pp. 69-73.
- Belyagoubi-larbi M. (2007). Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales
- Ben Ammar R., Kilani S., Bouhleb I., Ezzi L., Skandrani I., Boubaker J., Ben Sghaier M., Naffeti A., Mahmoud A., Chekir-Ghedira L. and Ghedira K. Antiproliferative, Antioxidant, and Antimutagenic Activities of Flavonoid-Enriched Extracts from (Tunisian) *Rhamnus*

*alaternus* L.: Combination with the Phytochemical Composition. *Drug. Chem. Toxicol.* (2008). 31: 61-80.

-Benmansour-Bnxi G. N. (2005). Etude microbiologique et mycotoxicologique des blés stockés dans la région de Tlemcen et l'influence des facteurs physiques sur l'aflatoxinogénèse. Thèse de Magister, Algérie, Département de Biologie - Faculté des Sciences, Université Djillali Liabes - Sidi Bel Abbes -. 106 pages.

-Billing J. and Sherman P. W. Antimicrobial Functions of Spices: Why Some Like it Hot. *Q.Rev. Biol.* 1998; 73: 3-49.

-Boizot N., and Charpentier J.P. (2006). Méthode rapide d'évaluation du contenu en composés phénoliques des organes d'un arbre foustier. *Le cahier des techniques de l'Inra*. Pp 79-82. (cited in DjemaiZoueglache S, 2008).

-Bonina F., Puglia C., Ventura D., Aquino R., Tortora S., Sacchi A., Saija A., Tomanio A., Pellegrino M.L. et De Carparis, P. (2002). *In vitro* antioxidant and in vivo photoprotective effects of a lyophilized extract of *Capparis spinosa* L. buds. *Journal of Cosmetic Science*, 53:321-335.

-Bonjean A., Picard E., 1991- Les céréales à paille. Origine-histoire-économie-sélection. Ligugé; Poitiers : *Aubin imprimeur*. 36p.

-Botton B., Bretton A., Fever M., Gautier S., Guy Ph., Larpent J.P., Reymond P., Sanglier J-J., Vayssier Y and Veau P. (1990). Moisissures utiles et nuisibles, importance industrielle. (edn) Masson, Paris. 512p.

-Bouchet P. H., guignard J. L. et Vihard J. Les champignons mycologie fondamentale et appliquée.

-Boudjouref M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de Magister en Biochimie. Université Ferhat Abbes, Sétif. Algérie. 99 p.

-Bouix M. et Leveau J. Y.(1999). Production des enzymes in Scriban R. *Biotechnologies Ed Lavoisier* p. 344-400.

-Brantner A., Males A., pepeljak, S. et antolic, A. (1996). Antibacterial activity of *aliurus spina-Christ* Mill (*Christis thorn*). *Journal of Ethnopharmacol* 52, 119-122.

-Bruneton J. (1999). Pharmacognosie, phytochimie. Plantes médicinales. Ed. Technique et Documentation. 3ème ed, Paris. France. 1120p.

-Bruneton J. Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. Ed. mdicales internationales Editions Technique et Documentation, Cachan, [S.l.], 1999, p. 647-673.

-Celiktas O.Y., Kocabas E.E.H., Bedir E., Sukan F.V., Ozek T., Baser K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of

*Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*. 100: 553–559.

-Cherkaoui-Tangi K., Lachkar M., Wibo M., Morel N., Gilani A.H., Lyoussi B., Pharmacological studies on hypotensive, diuretic and vasodilator activities of chrysin glucoside from *Calycotome villosa* in rats. *Journal of Phytotherapy Research*, Vol.22, Issue:3, Mar 2008, pp.356-361.

-Choi Y.M., Noh D.O., Cho S.Y., Suh H.J., Kim K.M., and Kim J.M. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT*. 39:756-761.

-Cosentino S. et Tuberoso C. I. G. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian Thymus essential oils. *Let Appl Microbial*, 29(2): 130- 135..

-Cowan M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin. Microbiol. Rev.* (1999).12: 564-582.

-Damerdjil A. diversité orthoptérologique sur trois plantes Xérophiles (diss – doum -genêt) dans les environs de Tlemcen (Algérie nord - occidentale). *Rev. Ivoir. Sci. Technol.*(2011). 17: 67–78.

-De Billerbeck V. G. (2000). Activité antifongique de l'huile essentielle de *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson sur *Aspergillus figer*. Évaluation d'un bioréacteur pour l'étude de l'effet inhibiteur de substances volatiles en phase vapeur. Thèse de doctorat de l'I.N.P.T.

-Deans S. G. et Ritchie G.. (1987). Antimicrobial properties of plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, 5: 162-180.

-Dessì M.A., Deiana M., Rosa A., Piredda M., Cottiglia F., Bonsignore L., Deidda D., Pompei R., Corongiu F.P., Antioxidant activity of extracts from plants growing in Sardinia. *Journal of Phytotherapy Research*, Vol. 15, Issue: 6, September 2001, pp. 511–518.

-Djerassi C., RM. Mc. Donald and A. J. Lem., J. Amer.(1953). *Chem. Soc.*, 75, 5940.

-Domínguez E., *Calicotome villosa* Link. (Ed. Ketres) Valdés B., Talavera. S., Fernández Galiano E., *Flora Vasculare de Andalucía Occidental*, Vol. 2, 1987, pp. 45-170.

-Dorman H.J.D.(2000). Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oil. *Journal of Applied Microbiology*. 88-308-316.

-Doughari J.H., Pukuma M.S., and DE N. (2007). Antibacterial effects of *Balanites aegyptiaca* L. Drel. and *Moringa oleifera* Lam. on *Salmonella typhi*, *African Journal of biotechnology*, 6 (19), p. 2212 - 2215.

-Doumandji A., Doumandji-mitiche B., Salaheddine D. (2003). Cours de technologie des cereales technologie de transformation des blés et problèmes dus aux insectes au stockage. Office des Publications Universitaires, pp. 1-22.

-Dubois G et Flodrops F.(1987). la protection de semence. AGRI-NAHAN, . 96p.

- El Antri A., Lachkar N., El Hajjaji H., Gaamoussi F., Lyoussi B., El Bali B., Morel N., Allouchi H., Lachkar M., Structure elucidation and vasodilator activity of methoxyflavonols from *Calycotome villosa* subsp. *intermedia*. *Arabian Journal of Chemistry*, Vol.3, Issue: 3, July 2010, pp.173–178.
- Erroux J. (1974). *Agronomie méditerranéenne*. 1. Le milieu méditerranéen et ses problèmes. La culture vivrière en Algérie. 387p.
- Gacem M. A. (2011). contribution à l'étude de l'activité antifongique et antimycotoxinogène des extraits méthanolique et aqueux des graines de *Citrullus colocynthis* sur la croissance de quelque moisissure d'altération de blé tendre stocké. thse de magister- universite KASDI MERBAH-Ouargla.
- Garcia-Ruiz A., Bartolomé B., Martinez-Rodriguez A.J., Pueyo E., Martin-Alvarez P.J., and Moreno-Arribas M.V. (2008). Potential of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*. 19: 835–841.
- Georgé S., Brat P., Alter P., Amiot J.M. (2005). Rapid determination of polyphénols and vitamin C in plant-derived products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 1370-1373.
- Ghiasian S.A., Bacheh P. K., Rezayat S. M., Maghsood A. H., Taherkhani H. (2004). Mycoflora of Iranian maize harvested in the main production areas in 2000. *Mycopathologia* 158: 113–121.
- Godon B et Loisel W. (1997). *Guide pratique d'analyses dans les industries des céréales*. 2eme Ed, Tech & Doc Lavoisier, Paris, pp. 819.
- Gonzalez H.H.L. , Resnik S.L., Boca R.T., Marasas W.F.O. (1995). Mycoflora of Argentinian corn harvested in the main production area in 1990. *Mycopathologia*. 130: 29-36.
- Gorham J. (1977). Lunularic acid and related compounds in liverworts, algae and hydrangea. *Phytochemistry*. Vol. (16):249-253. 57.
- Guignard J.L. (1996). *Biochimie végétale*. Ed. Masson, Paris. France. 274 p
- Guiraud J.P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris : 8-101,.
- Guiraud J.P. (2003). *Microbiologie alimentaires*. (edn) Dunod. Paris. 651p.
- Harborne J.B. (1980) *Plant Phenolics: Encyclopedia of Plant Physiology*. New series. Vol. (8): 329-402.
- Harrar A. (2012). Activités antioxydante et antimicrobienne d'extraits de *Rhamnus alaternus* L. thse de magister- universite FERHAT ABBAS-Sétif.
- Hennebelle T., Sahpaz S., Bailleul F. (2004). Polyphénols végétaux, sources, utilisations et potentiel dans la lutte contre le stress oxydatif. *Phytothérapie*. Vol (1): 3-6.

- Hensen L., Hammershøy O., Boll P.M., Allergic contact dermatitis from faltarinol isolated from *Schefflera arboricola*. *Contact Dermatitis*, Vol. 14, Issue:2, 1986, pp.91–93.
- Huang Guangrong., Jiang Jiabin.,and Dai Dehui. (2008). Antioxidative and antibacterial activity of the methanol extract of *Artemisia anomala* S. Moore. *African Journal of Biotechnol.*7 (9): 1335-1338.
- Hunneke S. and Lehn J. M. (1963). *Bull. Soc. Chim. Fr.* 321.
- Jasso de Rodríguez D, Hernández-Castillo D, Rodríguez-García R, Angulo-Sánchez JL (2005). Antifungal activity in vitro of Aloe vera pulp and liquid fraction against plant pathogenic fungi. *Ind Crops Prod* 21:81–87
- Jürgen R., Paul .S., Ulrike S., and Reinhard S. (2009). Essential Oils of Aromatic Plants with Antibacterial, Antifungal, Antiviral, and Cytotoxic Properties– an Overview: *Forsch Komplementmed.*16: 79–90.
- Kandil O., Radwan N.M., Hassan A.B., Amer A. M. M., El-Banna H. A. and Amer M. M. (1994). Extracts and Fractions of *Thymus capitatus* exhibit antimicrobial activities. *Journal of Ethnopharmacology* 44, pp. 19-24.
- Kaufmann SHE. Host response to intracellular pathogens. Ed. Springer ; R.G. Landes, New York; Austin.(1997). p. 345.
- Krimat S., Dob T., Lamari L., Boumeridja S., Chelghoum Ch. and Metidji H. (2014). Antioxidant and antimicrobial activities of selected medicinal plants from Algeria. *Journal of Coastal Life Medicine* 2014; 2(6): 478-483.
- Larit. F., Benyahla. S., Benayache. S., Benayache.F., Leon. F., Brouard. I., Bermijo. J. Flavonoïdes from *calycotome spinosa* L. *Int. J. Med. Arom. Plants*, 2012. 2(1): 34-37.
- Li H.B., Cheng K.W., Wong C.C., Fan K.W., Chen F., Jiang, Y. (2007). Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food chemistry*. 102:771-776.
- Loy G., Cottiglia F., Garau D., Deidda D., Pompei R., Bonsignore L., Chemical composition and cytotoxic and antimicrobial activity of *Calycotome villosa* (Poiret) Link leaves, *Il Farmaco*, Vol. 56, Issues: 5–7, July 2001, pp. 433–436.
- Macheix J.J., Fleuriet A., Sarni-manchado P.( 2006). Les Polyphénols en agroalimentaire. Ed. Tec et Doc, Paris. France. Pp:1-28.
- Malloch D. Mould isolation, cultivation and identification. University of Toronto.(1997).
- Martin S, Andriantsitohaina R. Cellular mechanism of vasculo-protection induced by polyphenols on the endothelium. *Ann. Cardiol. Angéiol.* 2002, 51 (6): 304-15.
- Maurice N. L'herboristerie d'antan à la phytothérapie moléculaire du XXIe siècle. Ed.Lavoisier, Paris, 1997, p. 12-14.

- Mills J.T.( 1990). Mycotoxins and fungi on cereal grains in western Canada. *Can. J.Physiol. Pharmacol* 68, 982-986.
- Mokhtari M. Etude phytochimique de la plante *calycotome spinosa. link*. Chimie Organique. Université El-Hadj Lakhdar. Batna. Algérie, 2012. p : 15.
- Molinié A. et Pfohl-Leszkowicz A. (2003). Les mycotoxines dans les céréales les points importants de contrôle de la production au stockage, le devenir dans les produits dérivés. Laboratoire de Toxicologie et sécurité alimentaire- Auzeville - Tolosane. *Note de l'ASEDISSO N° spécial Mycotoxines* .9 pages.
- Molinié A., Faucet V., Castegnaro M. et 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.
- Moreau C. Les moisissures In Bourgeois C. M., Mescle J.F. & Zucca J.. Microbiologie alimentaire,
- Muller C. et Laroppe E.( 1993). Conservation et germination des semences. *Revue Forestière Française*.Vol .XLV (3), 253-260.
- Multon J. L. (1982). Conservation et stockage des grains et graines et produits dérivés-céréales, oléagineux, protéagineux, aliments pour animaux. *Technique & Documentation Lavoisier Paris Apria*. Volume 1, 576 Pages.
- Naili M.B., Alghazeer O.A., Saleh N.A., Al-Najjar A.Y. (2010). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Artemisia campestris* (Astraceae) and *Ziziphus lotus* (Rhamnaceae). *Arab. J. Chem.* 3: 79–84.
- Newman d.J., Cragg g.M.( 2012 ). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *J. Nat. Prod.* Vol. (75): 311-335.
- Nguymen M. (2007). Identification Des Espèces De Moisissures, Potentiellement Productrices De Mycotoxines Dans Le Riz Commercialise Dans Cinq Provinces De La Region Centrale Du Vietnam - Etude Des Conditions Pouvant Reduire La Production Des Mycotoxines. Thèse De Doctorat D'université : Génie Des Procédés Et De L'environnement. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 147p.
- Olsson J.( 2000). Modern Methods in Cereal Grain Mycology. Doctoral thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Agraria, pp. 37-241.
- Pacin A.M., González H.H.L., Etcheverry M., Resnik S.L., Vivas L., Espin S.(2002). Fungi associated with food and feed commodities from Ecuador. *Mycopathologia* 156: 87–92
- Pattnaik S. Subramanyam V. R. et Kole C. (1996). Antibacterial and antifungal activity of essential oils *in vitro*. *Microbios* 86, pp. 237-246.

- Peeking A., Picand B., Hacene K., Lokiec F., Guerin P.( 1987). Oligimères procyanidoliques (Endotélon) et système lymphatique. Artères et Veines. Publications médicales AGCF. Vol. (6): 512-513.
- Pfohl-Leszkowicz A. (1999). Les mycotoxines dans l'alimentation, Évaluation et gestion du risque. Lavoisier, collection Tec&Doc. 478 pages.
- Plotis E. N., Bjorkwist D., Bjorkqwuist O and Sarkanen S. (1973). J. Amer. Chem. Soc., 91, 23.
- Ponce a G., Fritz r., Del valle C. et Roura s.I. (2003).Antimicrobial activity of oils on the native microflora of organic Swiss chard. Society of Food Science and Technology (Elsevier).36: 679-684.
- Quèzel P., Santa S., Nouvelle flore de l'Algérie et des régions désertiques méridionales, Tome2, Ed. Centre nationale de la recherche scientifique, Paris, 1963, pp.935-936.
- Rojas A., Hernandez L., Pereda-Miranda R., and Mata R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 35: 275-283.
- Ruberto G., Baratta M. T.; Sari, M. and Kaâbeche M. (2002). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from Algerian *Origanum glandulosum* Desf. Flavour and Fragrance Journal 17, pp. 251-254.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., Bruni, R. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chem.*, 91: 621-632.
- Sari. M., Hendel. N., Sarri. D., Boudjelal. A., Benkhaled. A. Ethnobotanical study of medicinal Flora used by the people of the Forest El Haourane-Msila (Alegria). *Journal Of Ecoagritourism*, 2013. 9(2): 27.
- Sawadogo M., A. V. Tessier and P. Delavau. (1985). Ann. Pharm. Fr., 43, 89.
- SFM.(2008).Société Française de Microbiologie, Recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, Janvier 2008, 49p.
- 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.
- Shibnath Ghosal, Yattendra Kumar, Dilipk.(1986). Phytochem., 27, 1097.
- Singleton V.L., Orthofer R., and Lamuela-Raventos R. M.(1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of FolinCiocalteu reagent. *Method.Enzymol.* 299: 152-178.

- Sini K.R., Sinha B.N. and Karpagavalli M. (2010). Determining the antioxidant activity of certain medicinal plants of Attapady, (Palakkad), India using DPPH assay. *Curr Bot* 2010; 1(1): 13-16.
- Skandamis P.N. and Nychas G.J.E.(2001). Effect of oregano essential oil on microbiological and physico-chemical attributes of minced meat stored in air and modified atmospheres. *J.Applied Microbiol.* 91: 1011-1022.
- Skrinjar M, Stubblefield RO, Vujicic IF. Ochratoxigenic moulds and ochratoxin A in forages and grain feeds. *Acta Vet Hung* 1992; 40(3): 185–190.
- Sokmen A, Sokmen M, Daferera D, Polissiou M, Candan F, Unlu M, Akpulat HA. The in vitro antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil and methanol extracts of *Achillea biebersteini* Afan. (Asteraceae) *Phytother Res.* 2004;18:451–456. doi: 10.1002/ptr.1438.
- Takahashi J.A., Monteiro de Castro M.C., Souza G.G., Lucas E.M.F., Bracarense A.A.P., Abreu L.M., et al. (2008). Isolation and screening of fungal species isolated from Brazilian cerrado soil for antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* and *Listeria monocytogenes*. *J.med. mycol.* 18: 198-204.
- Teixeira da Silva J. A. Mining the essential oils of the *Anthemideae*. *Afr. J. Biotechnol.* (2004).3: 706-720.
- Tozlovanu M.( 2008). Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérogènes (notamment l’ochratoxine A) : Validation de biomarqueurs d’exposition et d’effet. Thèse de doctorat d’université : Toxicologie et Sécurité des Aliments. Toulouse : Institut National Polytechnique. France. 261p.
- Wan J., Wilcock A., and Coventry M.J. (1998). The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonashydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Microbiol.*84:152-158.
- Xue H. Z., Lu Z. Z., Konno C. , Soejarto D. D., Cordel G. A., Fong H. S. S. and Hodgson W. (1988). *Phytochem*, 27, 233.
- Yekhlef ghania. (2011). L’étude des activités biologiques des extraits des feuilles de *Laurus nobilis*, *Thymus vulgaris*. Thèse de magistère. PP : 170.
- Yves.H et De Buyser.J.( 2001). De la graine à la plante, l’origine des blés. *BELIN POUR LA SIENCE*, 69-72 PP .
- ZAIKA L. (1988). Spices and Herbs : Their Antimicrobial Activité and Its Determination. *Journal of Food Saftey*, 9(2): 97-118.
- Zaitlin B., Watson S. B., Ridal D., Stachwill T. et Parkinson D.. Actinomycetes in Lake Ontario, habitats and geosmim and MIB production, 95 (2), 2003, p.113-118.

-Zucca J. (coord.). *Microbiologie alimentaire : Aspects microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments*. Ed. Tec & Doc, Paris, pp. 392-414.

# Résumé

## Résumé

Ce travail s'inscrit dans l'objectif d'une évaluation de l'activité antifongique et antibactérienne *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique des feuilles et des tiges de *calycotome spinosa*.

Pour cela, l'isolement, la purification et l'identification des moisissures de stockage à partir des grains de blé dur ont été effectuées. Ainsi que l'extraction des métabolites secondaires (polyphénols) de la partie aérienne de cette plante en utilisant l'eau distillée et le méthanol. De plus, la méthode de Folin Ciocalteu a été utilisée pour la quantification des polyphénols totaux. En fin, l'activité antibactérienne et antifongique des quatre extraits contre des nombreux microorganismes pathogènes a été également étudiée en utilisant la méthode de diffusion pour les bactéries. Les résultats d'isolement ont montré que quatre genres des moisissures ont été isolés à partir du blé dur stocké: *Alternaria* (2 espèces), *Penicillium* (2 espèces), *Aspergillus* et *Rhizopus*. La quantité des polyphénols est variée entre les quatre extraits, la plus grande quantité a été détectée dans EMF (3,029 mg EAG/mg d'extrait). Les résultats de l'activité antifongique révèlent que l'EAT de *Calycotome spinosa* possède un effet plus antagoniste (54%) contre *Alternaria alternata* que les autres extraits. En effet, l'EMF a démontré un effet fongistatique remarquable contre *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Penicillium sp1* et *Aspergillus sp*. Les deux souches fongiques *Penicillium sp.2* et *Rhizopus sp*. sont résistantes aux tous les extraits. Pour l'activité antibactérienne, nos résultats ont montré que l'EMF était le plus actif contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *S. abony*, mais il ne présentait aucune activité contre *Streptococcus sp. et Klebsiella sp.* semblablement avec les trois autres extraits.

**Mots clés :** Blé dur, moisissures de stockage, *Calycotome spinosa*, activité anti fongique, activité antimicrobienne, polyphénols totaux.

## Abstract

The objective of this work is the evaluation of antifungal and antibacterial potential, *in vitro*, of aqueous and methanol extracts from leaves and stems of *Calycotome spinosa*.

For this reason, the isolation, the purification and the identification of storage molds from the durum wheat grains were carried out. As well as the extraction of secondary metabolites (polyphenols) from the aerial part of this plant using distilled water and methanol. In addition, the Folin Ciocalteu method was used for the quantification of total polyphenols. Finally, the antimicrobial activity of the four extracts against many pathogenic microorganisms was also studied using the disc diffusion method for bacteria. The isolation results showed that four genera of fungi were isolated from stored durum wheat: *Alternaria* (2 species), *Penicillium* (2 species), *Aspergillus* and *Rhizopus*. The results of the antifungal activity revealed that the extract EAT of *Calycotome spinosa* had the highest antagonistic effect (54%) against *Alternaria alternata*. Indeed, EMF extract has demonstrated a remarkable fungi-static effect against *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Penicillium sp1* and *Aspergillus sp.*. The two fungal strains; *Penicillium sp.2* and *Rhizopus sp.* were resistant to all extracts. For antibacterial activity, our results showed that the extract EMF was the most active against *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella abony*, but it did not show any activity against *Streptococcus sp.* and *Klebsiella sp.* as well as the other three extracts. The amount of the polyphenols was varied between the four extracts; the greatest amount was detected in EMF by 3,029 mg EAG / mg extract.

**Key words:** Durum wheat, storage molds, *Calycotome spinosa*, antifungal activity, antimicrobial activity, total polyphenols.

## الملخص

الهدف من هذا العمل هو تقييم النشاط المضاد للفطريات والمضاد للبكتيريا في المختبر للمستخلص المائي والميثانولي لأوراق وسيقان القندول الشوكي *Calycotome spinosa* . لهذا الغرض، تم عزل وتنقية وتحديد جنس فطريات التخزين من حبوب القمح الصلب. فضلا عن استخراج المركبات الثانوية (البوليفينول) من الجزء الهوائي من هذا النبات باستخدام الماء المقطر والميثانول. . بالإضافة إلى ذلك ، تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات للأربع مستخلصات ضد العديد من الكائنات الحية الدقيقة الممرضة وقد استخدمت طريقة النشر بالنسبة للبكتيريا. في نهاية المطاف ، استعملت طريقة Folin Ciocalteu لتقدير كمية البوليفينول. وأظهرت النتائج أنه تم عزل أربعة أجناس فطرية من القمح الصلب المخزن *Alternaria* (نوعين) *Penicillium* (نوعين) *Aspergillus* (نوعين) و *Rhizopus* . نتائج النشاط المضاد للفطريات تكشف أن أكبر نشاط سجل من طرف مستخلص EAT (*Alternaria alternata* ضد 54%). في الواقع، أظهر EMF تأثير ملحوظ ضد *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Penicillium sp1* *Aspergillus* و *2Penicillium* و *Rhizopus sp.* هي مقاومة لجميع المستخلصات. فيم يخص النشاط المضاد للبكتيريا، أظهرت النتائج أن EMF كان الأكثر فعالية ضد *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* و *Salmonella abony* ، لكنه لم يظهر أي نشاط ضد *Streptococcus sp.* و *Klebsiella sp.* مثل المستخلصات الثلاثة الأخرى. وتتنوع كمية البوليفينول بين المستخلصات الأربعة، و أكبر كمية كانت في EMF (3,029 mg EAG/ g ) من المستخلص.

**الكلمات المفتاحية:** القمح الصلب، فطريات التخزين، قندول شوكي *Calycotome spinosa* ، النشاط المضاد للفطريات، النشاط المضادة للميكروبات، polyphenols.

**Activité antifongique de quelques extraits de plante endémique sur des moisissures du blé stocké**

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie des mycète

**Résumé**

Ce travail s'inscrit dans l'objectif d'une évaluation de l'activité antifongique et antibactérienne *in vitro* des extraits aqueux et méthanolique des feuilles et des tiges de *calycotome spinosa*.

Pour cela, l'isolement, la purification et l'identification des moisissures de stockage à partir des grains de blé dur ont été effectuées. Ainsi que l'extraction des métabolites secondaires (polyphénols) de la partie aérienne de cette plante en utilisant l'eau distillée et le méthanol. De plus, la méthode de Folin Ciocalteu a été utilisée pour la quantification des polyphénols totaux. En fin, l'activité antibactérienne et antifongique des quatre extraits contre des nombreux microorganismes pathogènes a été également étudiée en utilisant la méthode de diffusion pour les bactéries. Les résultats d'isolement ont montré que quatre genres des moisissures ont été isolés à partir du blé dur stocké: *Alternaria* (2 espèces), *Penicillium* (2 espèces), *Aspergillus* et *Rhizopus*. La quantité des polyphénols est varié entre les quatre extraits, la plus grande quantité a été détectée dans EMF (3,029 mg EAG/mg d'extrait). Les résultats de l'activité antifongique révèlent que l'EAT de *Calycotome spinosa* possède un effet plus antagoniste (54%) contre *Alternaria alternata* que les autres extraits. En effet, l'EMF a démontré un effet fongistatique remarquable contre *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Penicillium sp1* et *Aspergillus sp*. Les deux souches fongiques *Penicillium sp.2* et *Rhizopus sp*. sont résistantes aux tous les extraits. Pour l'activité antibactérienne, nos résultats ont montré que l'EMF était le plus actif contre *B. subtilis*, *S. aureus* et *S. abony*, mais il ne présentait aucune activité contre *Streptococcus sp. et Klebsiella sp*. semblablement avec les trois autres extraits.

**Mots clés :** Blé dur, moisissures de stockage, *Calycotome spinosa*, activité anti fongique, activité antimicrobienne, polyphénols totaux.

**Laboratoire de recherche :** Laboratoire de Mycologie, de Biotechnologie, et de l'Activité Microbienne (LaMyBAM)- Faculté des sciences de la nature et de la vie. Université des Frères Mentouri –Constantine-

Jury d'évaluation :

**Président du jury :** Mr. KACEM CHAOUICHE N.

Pr - UFM Constantine

**Rapporteur :** Mme. CHERFIA Radia

M.A.A- UFM Constantine

**Examineur :** Mme. GHORRI Sana

M.A.B- UFM Constantine.

**Date de soutenance :** 04/07/2017