

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE & BIOCHIMIE

N° :



DOMAINE : SCINCES DE LA NATURE ET DE LA VIE

FILIERE : SCIENCE BIOLOGIQUE

OPTION : MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

**Mémoire présenté pour l'obtention**

**Du diplôme de Master Académique**

Par : BOUCHAALA Rania

CHABIRA Zineb

LATRACHE Dalel

**Intitulé**

**Dosage et activité antifongique d'un extrait organique d'une plante à usage médicinale**

Soutenu devant le jury composé de :

Dr. RABAH N	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Président
Dr. SELLOUM M	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Rapporteur
Dr. BOUBEKEUR H	Université Mohamed Boudiaf M'sila	Examineur

Année universitaire : 2023 /2024

## Dédicace

Avec tous mes sentiments de respect je dédie ma remise de diplôme et ma joie à celui qui m'a honoré, préservant l'héritage de son prophète, à celui qui m'a appris que le succès ne vient qu'avec la patience et la détermination, mon premier soutien, à celui à qui revient le mérite après Dieu à mon appui, ma fierté, mon honneur, mon père."

À celle qui a facilité mes difficultés par ses prières, à celle sous les pieds de qui se trouve le paradis, à mes espoirs, ma confiance et mon pilier solide, à celle qui a souhaité voir ce jour, à ma chère maman."

À la lumière de mes yeux, à ceux que Dieu a renforcés en les plaçant à mes côtés, à mes frères Bilal et Hammada, à la princesse de notre maison ma petite sœur, Jihan

À ceux dont ma joie serait incomplète sans leur présence et dont mon succès serait incomplet sans leur fierté, qui sont more a cause de cancer, à mon oncle Kamal et à mon oncle Saleh (qu'Allah paix à son âmes)."

À mes amies proches Nadjoi Zineb.

A mon binôme Rania qui devient chère Amie.

À mon encadrant Dr. Selloum Mounir le meilleur choix, qui n'a jamais déçu nos attentes. ».

"Enfin, à chaque individu qui a planté un espoir dans mon cœur, qu'il soit de ma famille ou de mes collègues

*Dalef*

## اهداء

أحمد الله عز وجل على منه وعونه لإتمام هذا البحث.

إلى الذي وهبني كل ما يملك حتى أحقق له آماله، إلى من كان يدفعني قدما نحو الأمام لنيل المبتغى، إلى الإنسان الذي امتلك الإنسانية بكل قوة، إلى الذي سهر

على تعليمي بتضحيات حسام مترجمة في تقديسه للعلم، إلى مدرستي الأولى في الحياة أبي الغالي على قلبي أطال الله في عمره؛

إلى التي وهبت فلذة كبدها كل العطاء والحنان، إلى التي صبرت على كل شيء، التي رعتني حق الرعاية وكانت سندي في الشدائد، وكانت دعواها لي بالتوفيق،

تتبعني خطوة خطوة في عملي، إلى من ارتحت كلما تذكرت ابتسامتها في وجهي نبع الحنان أمي أعز ملاك على القلب والعين جزاها الله عني خير الجزاء في

الدارين؛ إليهما أهدي هذا العمل المتواضع لكي أدخل على قلبهما شيئا من السعادة

إلى اخي الغالي نصر الدين وزوجته الكريمة

إلى اختي الحبيبة اية سلسبيل وصغيرتي مهجة البيت نور الهدى

الذين تقاسموا ا معي عبء الحياة

إلى مدللتي نوال وعزيزي محمد عبد الرؤف

أتمنى لهم كل النجاح والتوفيق

إلى من جمعني بهم الحياة رفيقتاي في البحث زينب ودلال انار الله دريهم

إلى صديقتي

إلى كل عائلتي " بوشعالة " و " بلواضح "

كما أهدي ثمرة جهدي لأستاذي الكريم الدكتور: سلوم منير الذي كلما تظلمت الطريق أمامي لجأت إليه فأنارها لي وكلما دب اليأس في نفسي زرع فيا الأمل

لأسير قدما وكلما سألت عن معرفة زودني بما وكلما طلبت كمية من وقته الثمين وفره لي بالرغم من مسؤولياته المتعددة؛

إلى كل أساتذة قسم الميكروبيولوجيا والكيمياء الحيوية؛

وإلى كل من يؤمن بأن بذور نجاح التغيير هي في ذواتنا وفي أنفسنا قبل أن تكون في أشياء أخرى...

قال الله تعالى «: إن الله لا يغير ما يقوم حتى يغيروا ما بأنفسهم»

رب أوزعني أن أشكر نعمتك التي أنعمت علي و على والدي و أن أعمل صالحاً ترضاه وأدخلني برحمتك في عبادك الصالحين "

## رانيا

## *Dédicace*

À celui que Dieu a couronné de dignité et de dignité... À celui dont je porte le nom avec toute fierté.

### **Mon cher père**

À mon ange dans la vie, au sens de l'amour, au sens de la tendresse et du dévouement, au sourire de la vie et au secret de l'existence, à celle dont les prières étaient le secret de ma réussite. **Chère mère**

À mes chers frères **Omar, Farhat et Abdelmoumen**, à l'occasion de ma remise de diplôme, je tiens à vous exprimer ma profonde gratitude pour votre soutien indéfectible. Vous avez toujours été une source d'inspiration et un pilier solide tout au long de mon parcours éducatif. J'espère être toujours à la hauteur de votre confiance et partager ensemble encore plus de réussites dans le futur. et à mes chères sœurs **Naima, Manel, Ilham**

À mon soutien dans ma vie. Chacun a son propre nom et sa propre position. **Mes oncles : zoubir et Salah**

Aux épouses de mes oncles, aux membres de ma famille, à mes oncles, tantes et leurs enfants, à tous mes amis et proches sans exception, à tous mes camarades de classe.

Vers qui nous avons marché ensemble en ouvrant ensemble le chemin vers le succès, vers qui nous sommes unis main dans la main **Dalel et Rania**

Je tiens à exprimer ma plus profonde gratitude à Dr. Selloum pour son encadrement exceptionnel, son soutien indéfectible et ses précieux conseils tout au long de ce projet. Son expertise et sa bienveillance ont été des piliers essentiels à la réussite de ce travail. Merci pour votre patience et votre dévouement.

Je n'oublierai jamais la personne qui m'a aidé, m'a fourni des informations précieuses et a été pour moi un modèle d'humilité, le docteur Bel far. Vous avez mes sincères remerciements et ma gratitude.

*Zineb*

## **Remerciement**

Nous remercions Dieu, le Tout-Puissant, de nous avoir accordé la santé et la volonté nécessaires pour entreprendre et achever ce mémoire.

Nous tenons à exprimer nos remerciements les plus sincères et respectueux à Monsieur Dr. SELLOUM.M notre directeur de recherche, pour sa rigueur, sa patience, ses précieux conseils, son soutien indéfectible et sa présence constante tout au long de ce travail. C'est avec un immense plaisir que nous avons réalisé ce projet sous votre guidance.

Nos plus vifs remerciements vont à Mme Dr. RABAH N pour avoir accepté de présider le jury de ce modeste travail. Qu'il trouve ici l'expression de notre plus profond respect.

Nous adressons également notre reconnaissance à Mme Dr. BOUBEKEUR H pour avoir accepté d'examiner ce travail. Qu'elle trouve ici l'expression de notre gratitude sincère.

Nos remerciements s'étendent aussi à tous les responsables des laboratoires de biologie de l'université de M'sila pour leur soutien.

Nous remercions également Monsieur HANDEL.N et Monsieur HARRAR.N pour leur contribution.

Enfin, nous exprimons notre gratitude à toutes les personnes qui ont, de près ou de loin, contribué à la réalisation de ce travail.

# Sommaire

## Table des matières

Résumé.....	i
Liste des abréviations.....	ii
Liste des figures.....	iii
Liste des tableaux.....	iv
Introduction.....	1
I. Présentation de La plante (Ruta Chalepensis).....	2
I.1 Définition.....	2
I.2 Systématique.....	2
I.3 Caractéristiques des différentes parties de la plante.....	3
I.4 Usage traditionnel et médicinal.....	3
• Usage culinaire.....	3
• Usage médicinale.....	4
• Usage Vétérinaire.....	4
• Usage Agricoles.....	4
• Usage Cosmétique.....	4
I.5 Les métabolites secondaires.....	4
I.5.1 Les polyphénols.....	5
II Généralité sur les champignons utilisés.....	6
II.1 Aspergillus Niger.....	6
II.1.1 Description morphologique’’ macroscopique’’.....	6
II.2 Penicillium.....	6
II.2.1 Aspect macroscopique des mycéliums.....	7
II.3 Fusarium.....	7

II.3.1	Identification du genre <i>Fusarium</i> .....	7
II.4	Rhizopus.....	8
II.5	Alternaria.....	9
II.5.1	Critères d'identification .....	9
II.6	Techniques d'isolement des champignons .....	9
II.7	Extraction des molécules actives .....	10
II.7.1	La macération par solvant (macération hydro méthane).....	10
III.	Matériel expérimental : .....	11
III.1	Matériel végétal.....	11
III.2	Matériels et Produits utilisé :.....	11
III.3	Microorganismes testés .....	12
III.4	Méthodes : .....	12
III.4.1	Préparation de milieu de culture PDA .....	12
III.4.2	Préparation d'extrait .....	12
III.4.3	Extraction par macération .....	13
III.4.4	Rendement d'extrait hydro-méthanolique selon Yahyaoui (2005).....	15
III.4.5	Dosage des polyphénols et flavonoïdes .....	16
III.4.6	Isolement des champignons.....	16
III.4.7	L'activité antifongiques .....	17
III.5	Résultats et discussion .....	18
III.5.1	Extraction .....	18
III.5.2	Dosage des polyphénols et flavonoïdes .....	18
III.5.3	Isolement et identification des souches fongiques .....	22
III.5.4	Test d'activité antifongique.....	25
•	Conclusion.....	29

## ملخص

تم استخلاص المركبات الفينولية من الجزء الهوائي لنبات الفيجل باستخدام الميثانول مع الماء المقطر بواسطة النقع المزدوج. أظهرت النتائج أن المستخلص الخام له مردود قدر ب 18% أظهرت التقديرات الكمية لعديدات الفينول الكلية وعديدات الفلافونويد الكلية باستخدام الطرق اللونية الضوئية أن المستخلص الخام غني بهذه المركبات ( $11,34 \pm 108,60$  ميكروغرام EAG /ملغ) من المستخلص و( $0,60 \pm 9,72$  ميكروغرام /ملغ) من المستخلص على التوالي، أظهرت تقييمات النشاط المضاد للفطريات للمستخلص باستخدام طريقتي الدمج المباشر مع وسط النمو وطريقة الصب قي الأقراص ضد مجموعة من الفطريات المعزولة من بعض المواد الغذائية: *Alternaria ; Rhizopus ; Aspergillus ; Fusarium* و *Penicillium* بتركيز 1,5 غرام/مل أن المستخلص النباتي له تأثير بنسب مئوية متباينة على كل فطر. الكلمات المفتاحية: نبات الفيجل – المركبات الفينولية – الفطريات الملوثة للأغذية -المستخلص المائي الكحولي.

## **Abstract**

The phenolic compounds were extracted from the aerial part of the plant *Ruta chalepensis* using methanol with water distilled by double maceration. The results showed that the raw extract has a yield of 18%.

Quantitative estimates of polyphenols and flavonoids were shown using optical methods. The raw extract is rich in these compounds ( $108.60 \pm 11.34$  microgram EAG/mg) of the extract and ( $9.72 \pm 0.60$  microgram/mg), respectively, evaluates the antifungal activity of an extract using two methods: the incorporation of the extraction in the middle and the method of embedding the extracts into the discs. These methods test on fungal isoles: *Alternaria*; *Rhizopus*; *Aspergillus*; *Fusarium* and *Penicillium* at a concentration of 1.5 grams/mg showed that the plant extract has an effect on each fungus at different percentages.

Keywords: plant *Ruta chalepensis* – polyphenol – flavonoid – mushrooms– hydroalcoholic extract

## Résumé

Les composés phénoliques ont été extraits de la partie aérienne de la plante *Ruta chalepensis* à l'aide de méthanol avec de l'eau distillées par la double macération. Les résultats ont montré que l'extrait brut a un rendement de 18%.

Les estimations quantitatives des polyphénols et des flavonoïdes ont été montrées à l'aide de méthodes optiques. L'extrait brut est riche en ces composés ( $108,60 \pm 11,34$  microgrammes EAG /mg) de l'extrait et ( $9,72 \pm 0,60$  microgramme / mg), respectivement, les évaluations de l'activité antifongique d'un extrait à l'aide de deux méthodes : l'incorporation de l'extrait au milieu et la méthode d'imbibé l'extrait dans les disques. Ces méthodes testent sur des isolas fongiques : *Alternaria* ; *Rhizopus* ; *Aspergillus* ; *Fusarium* et *Penicillium* à une concentration de 1,5 grammes / mg ont montré que l'extrait végétale a un effet sur les chaque champignons a des différents pourcentages.

Mots clés : plante *Ruta chalepensis* –polyphénol – flavonoïde – champignons– extrait hydroalcoolique

## Liste des abréviations

**DMSO** : Diméthylsulfoxyde.

**Milieu PDA** : Milieu Potatoes Dextrose Agar.

**Milieu S** : Sabouraud.

**Milieu MEA** : Malt Agar Extract.

**Milieu CYA** : Czapek Yesat Agar.

**R %** : Rendement exprimé en %.

**M** : Masse en gramme de l'extrait sec résultant.

**M0** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter.

**(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)** : carbonate de sodium.

**EAG** : équivalent d'acide gallique.

**EQ** : équivalent Quercétine.

**µg** : microgrammes.

**Mg** : milligrammes.

**nm** :nanomètre.

**°C** : Celsius.

**EMeOH** : extrait methanolique.

**EBr** : extrait brut.

**EIM** : extrait incorporer au milieu.

**EID** : extrait imbibé au disque.

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Ruta chalepensis .....	2
<b>Figure 2</b> : Colonie d'A. Niger sur milieu Czapek après 7jours d'incubation à 25°C .....	6
<b>Figure 3</b> :aspect d'une souche de penicillium .....	7
<b>Figure 4</b> :aspect macroscopique de fusarium .....	8
<b>Figure 5</b> : Rhizopus GROWING ON SDA .....	8
<b>Figure 6</b> : Aspect macroscopique d'Alternaria .....	9
<b>Figure 7</b> : Localisation de Bou Saada par rapport à l'Algérie. ....	11
<b>Figure 8</b> :Les étapes de préparations de milieu de culture PDA.....	12
<b>Figure 9</b> : Ruta chalepensis avant (A) et après le broyage(B) . ....	13
<b>Figure 10</b> :macération dans l'alcool méthylique pendant 24h .....	13
<b>Figure 11</b> : filtration de l'extrait .....	14
<b>Figure 12</b> : Évaporation d'extrait par rotavapor . ....	15
<b>Figure 13</b> :l'extrait brut sèche .....	15
<b>Figure 14</b> : des échantillons endommages .....	17
<b>Figure 15</b> : Droite d'étalonnages de l'acide gallique .....	19
<b>Figure 16</b> : Droite d'étalonnages de la quercétine .....	20
<b>Figure 17</b> :Resultat de la fructification des champignons.....	22
<b>Figure 18</b> : penicillium.....	23
<b>Figure 19</b> : Alternaria.....	24
<b>Figure 20</b> : Aspergillus Niger. ....	24
<b>Figure 21</b> : Fusarium .....	25
<b>Figure 22</b> : Rhizopus .....	25
<b>Figure 23</b> : Activité antifongique de l'extrait d Ruta chalepensis sur les isolats fongiques.....	26
<b>Figure 24</b> : Croissance des champignons sur le Milieu PDA dans les trois situations .....	29

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Rendement (%) aspect et couleur de l'extrait brut sec de <i>Ruta chalepensis</i> . ....	18
<b>Tableau 2:</b> Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes.....	20
<b>Tableau 3:</b> Diamètre de croissance Mycélienne au 7 <sup>em</sup> jours(mm). ....	27
<b>Tableau 4:</b> pourcentage d'inhibition des champignons en présence d'extraits EIM et EID.....	27

# **Introduction**

### Introduction

Le rôle des champignons dans la dégradation des aliments est essentiel. On les trouve dans toutes les régions de la nature et ils ont une grande variété enzymatique, ce qui leur permet de cohabiter sur divers substrats. La qualité technologique et sanitaire est affectée par les champignons (allergie, agents toxiques responsables de graves intoxications chez l'homme et l'animal : mycotoxines), ce qui entraîne une diminution de la valeur nutritionnelle, une modification de l'aspect organoleptique et des problèmes économiques liés aux coûts de détoxification des grains ou aux rejets des produits contaminés. Différents genres de moisissures, tels que *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, sont reconnus pour leur capacité à contaminer les produits agricoles et/ou à produire des métabolites secondaires toxiques (Meyer *et al.*, 2004).

À l'heure actuelle, on emploie des fongicides et des insecticides tels que la phosphine, le malathox et le digran, entre autres. Plusieurs études montrent l'émergence des résistances des moisissures à ces substances chimiques. Ces produits entraînent à la fois des conséquences toxicologiques et environnementales. L'emploi des plantes médicinales remonte à une époque très reculée, Lors de la cuisson et de l'assaisonnement, il est essentiel de prendre en compte de nombreuses substances à activités antimicrobiennes, telles que les polyphénols. Ces substances jouent un rôle crucial dans la protection des plantes contre différentes attaques microbiennes, en particulier fongiques, qui pourraient causer la perte d'une grande quantité de végétation. C'est dans cette optique que nous avons tenté d'analyser l'effet de l'extrait d'une plante endémique et peu utilisée par la population sur la croissance des moisissures de dégradation des céréales, des fruits et des légumes en tant que substances naturelles complémentaires des produits chimiques utilisés dans les structures de stockage.

Dans cette étude, on a ciblé les objectifs suivants : purifier et caractérisé quelques champignons à partir des fruits : orange ; fraise et de pain. Déterminé le contenu de l'extrait hydroalcoolique de la plante *Ruta chalepensis* en polyphénol et flavonoïdes et testé son activité antifongique.

**Synthèse**  
**Bibliographique**

**Chapitre I :**  
**Présentation de**  
**La plante (*Ruta***  
***Chalepensis***

## I. Présentation de La plante (*Ruta Chalepensis*)

### I.1 Définition

Cette plante porte le nom de Ruta, un mot grec qui signifie « la libère ». Rue de Chalep est une espèce de plantes à fleurs appartenant à la famille des Rutaceae, appelée *Ruta chalepensis*. C'est une famille très importante avec près de 150 genres et plus de 1500 espèces. Ces plantes se rencontrent dans les régions tropicales et tempérées du globe. En Australie et notamment en Afrique du Sud. Il est originaire d'Eurasie et d'Afrique du Nord. *Ruta chalepensis* est une espèce méditerranéenne qui se rencontre dans toute l'Algérie, dans les rocailles et les zones secs du Tell. Plusieurs appellations ont été attribuées à *Ruta chalepensis* L, dépendant du pays et de la langue, elle est appelée communément Rue ou Ruda. En Algérie, elle est appelée Fijel ou Fidjel en arabe (Djaffar, Zenati, 2020).



**Figure 1** : *Ruta chalepensis* (Duke *et al*,2008)

### I.2 Systématique

**Règne** : Plantea

**Sous règne** : Tracheobionta (plantes vasculaires)

**Super division** : Spermatophyte (plantes à graine)

**Division** : Magnoliophyta (plantes à fleurs)

**Sous division** : Angiospermae

**Classe** : Magnoliopsida (dicotylédons)

**Sous classe :** Rosidae

**Super ordre :** Rutanae

**Ordre :** Sapindales

**Famille :** Rutaceae

**Genre :** Ruta

**Espèce :** *Ruta chalepensis* Selon ; WIART, 2006 ; BONNIER, 1999 ; TAKHTAJAN, 2009.

### **I.3 Caractéristiques des différentes parties de la plante**

C'est dans les lobes de la capsule rapprochés et non séparés que se trouvent les principaux caractères, qui distinguent cette espèce des autres, et dans les pétales dentées et ciliées à leur bord. Les tiges sont de forme droite, rameuse, cylindrique, rigide, glabre, mesurant de trois à quatre pieds de haut. D'un verre sombre. Elles sont également sans glande. Les feuilles sont larges de six (06) millimètres et elles ont des folioles ovales-oblongues. Ils sont cunéiformes, glauques et parfois presque droits. Les stipules des folioles inférieures sont pétiolulées (Bock, 2011).

De teinte verte-bleue, avec une saveur amère et une odeur forte plutôt désagréable (Tounsi et al, 2011). Les glandes à huiles de type schisolygènes sont présentes. Les Fleurs : Les fleurs sont jaunes, grandes, bractées, ovales ou lancéolées, souvent en forme de cœur. la base est bien plus large que le rameau ou le pédoncule qui les porte. Leur propre La taille est d'environ un centimètre de diamètre. Mise en place en corymbes à La partie terminale des tiges et des rameaux présente un calice court, glabre, ovale et divisé en cinq parties. La corole est d'un jaune avec cinq pétales concaves, ondulés, denticulés et ciliés à leurs extrémités.

Elles ont huit à dix étamines (8 à 10) et un ovaire antérieur. Selon Gunaydin et al., (2005). Les fruits se présentent sous forme de follicules à graines noires. (Lièvre, 2004). Ceux-ci sont des capsules globuleuses d'environ six (6) à neuf (9) millimètres de diamètre (Lamnauer et Batanouny, 2005).

### **I.4 Usage traditionnel et médicinal**

- **Usage culinaire**

Les feuilles fraîches sont comestibles, bien qu'elles soient très amères, elles sont employées pour parfumer le fromage blanc et dans la préparation d'un beurre aux herbes. Elle a également un parfum.

Quelques types de boissons alcoolisées (Bilderback, 2007).

- **Usage médicinale**

Les peaux sensibles sont irritées par sa sève. Les branches Patients atteints de phlébites et de varices. Elle ne doit pas être utilisée par les femmes enceintes (Le moine, 2001). Elle est aussi utilisée contre la gale et les parasites de la tête. Autres activités sont citées par Duke *et al.*, (2008) ; Analgésique ; Anti fertilité ; Anti-inflammatoire Antibactérien (contre : Bacillus, Candida, Escherichia, Microsporum, Pseudomonas, Staphylococcus) ; Antispasmodique ; Bactéricide ; Candidicide ; Cardiotonique ; Insectifuge ; Molluscicide ; Stomachique ; Sudorifique ; Vermifuge ; Vulnéraire ; antipyrétique, antiparasitaire et L'extraits aqueux de la rue a une activité hypotensive par un effet direct sur le système Cardiovasculaire.

- **Usage Vétérinaire**

Dans de nombreux remèdes vétérinaires, la rue a été employée pour traiter la fièvre bovine et les parasites intestinaux, ainsi que pour prévenir la rage. Autrefois, la rue a été utilisée pour aider à la défense contre la météorisation chez les bovins et les caprins.

- **Usage Agricoles**

En raison de sa forte odeur et de ses composés puissants, la rue était utilisée pour contrôler les ravageurs, notamment les insectes, et elle est toxique pour les mollusques, les poissons et les oiseaux. De plus, elle est réputée pour ses propriétés nématocides (Bel Bachir et Tchenar, 2019).

- **Usage Cosmétique**

Dans l'ensemble, la *Ruta Chalepensis* était utilisé dans le domaine de la parfumerie pour son arôme puissant.

## **I.5 Les métabolites secondaires**

Les métabolites secondaires sont de petites quantités de molécules organiques complexes produites et stockées par les plantes autotrophes. Ils sont principalement classés en trois grandes familles : les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (Lutge *et al.*, 2002 ; Abderrazak et Joël., 2007). Ils jouent un rôle dans l'ajustement de la plante à son environnement, ainsi que dans la régulation des symbioses et d'autres interactions entre les plantes et les animaux. Ils sont également utilisés pour protéger la plante contre les prédateurs et les pathogènes, tels que les agents allélopathiques, ou pour attirer les agents responsables de la pollinisation ou de la propagation des fruits (Judd *et al.*, 2002). La

production de métabolites secondaires est très limitée, il y a plus de 200 000 métabolites secondaires répartis en fonction de leur composition chimique (Vermerris, 2006).

### **I.5.1 Les polyphénols**

Les composés phénoliques représentent le groupe le plus abondant et le plus répandu dans le monde des végétaux, avec plus de 8000 structures phénoliques connues. La couleur et l'aroma des plantes, ainsi que leur astringence, sont influencées par la concentration et les modifications des phénols Lugasi *et al.*, (2003). Ces composés constituent entre 2 et 3% de la matière organique des plantes, et dans certains cas, jusqu'à 10%. Ces composés sont principalement utilisés chez les végétaux pour protéger contre les pathogènes et les herbivores, ainsi que pour réduire les dégâts causés par les radiations UV (Lebham, 2005). Les composants phénoliques principaux comprennent les acides phénoliques, les flavonoïdes, qui représentent plus de la moitié des polyphénols, les tanins et les coumarines.

#### **I.5.1.1 Les flavonoïdes**

Les flavonoïdes font référence à une variété étendue de composés naturels. Ils sont considérés comme des pigments presque universels des végétaux, souvent responsables de la coloration des fleurs, des fruits et parfois des feuilles. (Seyum *et al.*, 2006). Les flavonoïdes se présentent généralement sous forme d'hétérosides dans leur état naturel. En particulier, les flavonoïdes jouent un rôle essentiel dans le transport d'électrons lors de la photosynthèse chez les plantes et sont un antioxydant qui protège contre les effets néfastes des rayons ultraviolets (Havsteen, 2002). Les flavonoïdes sont classés en six classes qui se distinguent par leurs structures chimiques : les flavanols, les flavones, les flavonols, les flavanones, les isoflavones et les anthocyanidines (Medic Sanic *et al.*, 2004).

# **Chapitre II : Généralité sur les Champignons utilisées**

## II Généralité sur les champignons utilisés

### II.1 *Aspergillus Niger*

*Aspergillus* est l'un des genres les mieux définis du point de vue taxonomique parmi les champignons filamenteux, en raison de son importance économique. Al-Musallam a modifié la nomenclature du groupe A. Niger en se concentrant principalement sur les éléments clés. Éléments morphologiques pris en considération. Dernièrement, diverses approches ont été employées. Dans cette partie. Les espèces du groupe sont classées de manière différente en fonction des traitements taxonomiques. À titre d'exemple, Raper et Fennell ont présenté 12 espèces au sein de l'ensemble, Al-Musallam a reconnu 7 espèces d'*Aspergillus Niger* dans la section *Nige*, *Kusters et al* ont identifié 7 espèces. 6 espèces ont été acceptées (Koji *et al.*, 2001 ; Masayuki et Katsuya, 2010).

#### II.1.1 Description morphologique'' macroscopique''

A. Niger est un champignon microscopique qui endommage les récoltes lors de la conservation dans les silos ou les greniers. En 7 jours, il développe des colonies noires de 4 à 5 cm de diamètre dans un milieu Czapek incubé à une température de 25 °C (Pane *et al.*, 2011). D'abord, la colonie est blanche et translucide, puis elle devient noire en sporulant (Ayesha *et al.*, 2003).



**Figure 2:** Colonie d'A. Niger sur milieu Czapek après 7 jours d'incubation à 25°C (Nguyen, 2007).

### II.2 *Penicillium*

Les champignons imparfaits *Penicillium* font partie du phylum des ascomycètes. Ils se trouvent fréquemment dans le sol, l'air et sur des végétaux et des produits alimentaires tels que le compost, le bois, les produits alimentaires secs, les épices, les céréales, les fruits frais, les légumes, etc. Ils jouent un rôle essentiel dans différents processus naturels (Yadav *et al.* 2018).

### II.2.1 Aspect macroscopique des mycéliums

En règle générale, les mycéliums se développent rapidement. Ils se développent aisément dans des environnements de culture traditionnels tels que les milieux Sabouraud (S), Malt Agar Extract (MEA), Czapek Yesat Agar (CYA)...etc. Les couleurs des espèces peuvent varier d'une espèce à l'autre. Entre eux ; cette caractéristique est essentielle pour leur identification. (Figure 3).

Les mycéliums sont plats et ont souvent une texture veloutée ou duveteuse (Figure 4). Ces moisissures sont généralement de couleur bleue, verte, gris, jaune, olive, blanchâtre ou même rosâtre. Les mycéliums sont souvent recouverts de quelques gouttes d'exsudat, qu'il soit coloré ou non (Figure 3), ainsi que de pigments. Kochkouch *et al.* (2012), le revers peut varier de blanc à jaunâtre, voire beige.



Figure 3: aspect d'une souche de penicillium présentant un mycélium aplati, duveteux et avec des gouttelettes d'exsudat non coloré (Kim *et al* 2007).

### II.3 Fusarium

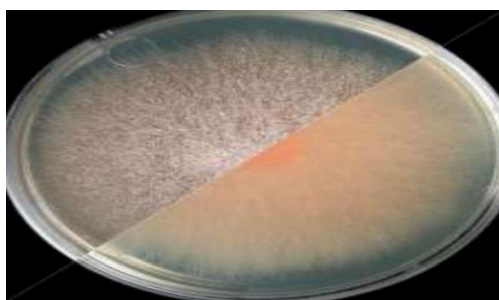
Il fait partie du phylum des Deutéromycètes (champignons imparfaits), car la majorité des espèces étaient décrites initialement par des caractéristiques morphologiques et il n'a pas été observé de reproduction sexuée. Le mycélium septé et la production de conidies hyalines, généralement unicellulaires sur des conidiophores libres, caractérisent ces formes imparfaites (anamorphes) et sont classées dans le groupe des Moniliales (Lepoivre, 2003). *Fusarium* génère également des macroconidies qui se composent de 2 à plusieurs cellules. Un des critères d'identification des représentants du genre est leur forme recourbée typique avec une cellule apicale plus ou moins pointue ; dans de nombreuses espèces, on peut observer une cellule basale en forme de pied. Les *Fusarium* produisent fréquemment des métabolites secondaires, en particulier des toxines (mycotoxines et phytotoxines), et le profil de ces composés peut servir à classer les espèces

#### II.3.1 Identification du genre *Fusarium*

L'identification est basée sur des caractéristiques culturales et morphologiques. Les caractères macroscopiques étaient les premiers utilisés pour identifier et classer les espèces appartenant au

genre *Fusarium* ; tels que l'aspect et la couleur des colonies, la vitesse de croissance, la production des pigments diffusibles durant le développement sur boîte de Pétri ; associés à des caractères microscopiques tels que la présence ou l'absence des micro conidies ,leur forme ainsi que leur disposition , la présence ou l'absence de chlamydozoospores , leur emplacement ( intercalaires ou terminales) et leur abondance, la forme et la taille de macroconidies, la forme de la cellule basale ..etc.(Jeunot, 2005 ; Heit, 2015).

Les espèces de *Fusarium* sont cultivées dans un milieu Sabouraud sans cycloheximide, mais elles se développent davantage dans une gélose au malt ou dans un milieu PDA. Leur température de croissance idéale s'étend de 22 à 37°C. Les colonies, qu'elles soient duveteuses ou cotonneuses, peuvent être de différentes couleurs (blanche, crème, jaune, rose, rouge, violette) en fonction des espèces. La diffusion d'un pigment dans la gélose est possible (Chabasse *et al.*, 2002 ; Sumerell *et al.*, 2003).



**Figure 4** :aspect macroscopique de fusarium (Ferdinand Khaoula *et al.*, 2022).

#### II.4 Rhizopus

Rhizopus sont des champignons saprophytiques trouvés sur les plantes et il est parasite sur les animaux. Ce sont des champignons multicellulaires, avec environ 8 espèces. Ils sont responsables de causer une infection opportuniste connue sous le nom de mucormycose invasive chez les humains et les animaux. Certaines espèces sont utilisées pour l'importance industrielle comme le rhizopus stolonifère qui a causé la moisissure du pain. Les infections du rhizopus peuvent également être une complication de l'acidocétose.



**Figure 5** : Rhizopus GROWING ON SDA (BrainKart and Dr. Gary E. Kaiser).

## II.5 Alternaria

Il s'agit de mycètes filamenteux de la famille des Deutéromycètes. On recense plus de 80 espèces. Les formes parfaites sont Clathrospora, Lewia et Pleospora, qui sont des ascomycètes. Ce genre comprend la principale espèce *Alternaria alternata*. Selon Pryoretal (2000), *Alternaria* est un genre très répandu, cosmopolite et saprophyte dont de nombreuses espèces se retrouvent dans le sol ou sur des tissus végétaux morts.

### II.5.1 Critères d'identification

- Macroscopiques :

Les colonies d'*Alternaria* ont un aspect velouté, de couleur grise à noire (fig6.) et à croissance rapide et leur température optimale de croissance est comprise entre 22°C et 27°C (Guillaume, 2006).



**Figure 6:** Aspect macroscopique d'*Alternaria* (Criquet et al., 2008)

Selon Bennoit (2011), certaines espèces telles que *Alternaria* peuvent devenir des agents pathogènes opportunistes qui causent des maladies chez l'Homme, les plantes et les insectes. De nombreuses espèces sont des phytopathogènes qui attaquent une variété de plantes, telles que les céréales, les cultures maraîchères et fruitières. *A. alternata* et *A. infectoria* sont responsables de la plupart des maladies chez l'Homme, tandis qu'une dizaine d'individus du genre *Alternaria* produisent des toxines fongiques (Paccoud *et al.*, 2022).

## II.6 Techniques d'isolement des champignons

L'identification des colonies repose sur la couleur ; les couleurs les plus courantes sont le blanc, le crème, le jaune, l'orange, le rouge jusqu'au violet ou le bleu, le vert, le brun jusqu'au noir. Il est possible de trouver les pigments dans le mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou de les diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*)

L'isolement consiste à réaliser à partir d'un échantillon d'un orange, fraise et du pain. Ces dernières sontensemencées sur milieu de culture solide. Au terme de l'incubation, les germes contenus dans

les fruits et le pain seront développés. Chaque germe sera à l'origine d'une colonie, le comptage des colonies permet par méthode de calcul simple.

## **II.7 Extraction des molécules actives**

### **II.7.1 La macération par solvant (macération hydro méthane)**

L'Extraction par macération dans l'éthanol aqueux (extraction solide/liquide), La macération (extraction solide- liquide) est une opération qui consiste à laisser Séjourner la matière végétale (broyat) dans le méthanol aqueux pour extraire les principes actifs (composés phénoliques et flavonoïdes). Cette méthode d'extraction a été effectuée selon le protocole décrit par (Hamia *et al.*, 2014). Avec quelques modifications, Le protocole de la macération de cette plante est le suivant :

- Peser 50 grammes de la matière végétale.
- Chauffer l'éthanol aqueux (70 /30) dans un bécher de 500 ml jusqu'à ébullition.
- Mettre la matière végétale (50 g) sur l'éthanol aqueux bouillant (70/30).
- Agiter de temps en temps jusqu'à parfaite refroidissement.
- Laisser macérer pendant 24 h sous agitation, ensuite filtrer sur un papier filtre Wathman (n°1)
- Récupérer le filtrat dans un flacon.
- Répéter la procédure trois fois (fraction retenue par le filtre dans 200 ml éthanol aqueux bouillant).
- Les macéras hydroalcoolique de 3 jours sont placés dans un seul récipient.

**Partie Pratique :**

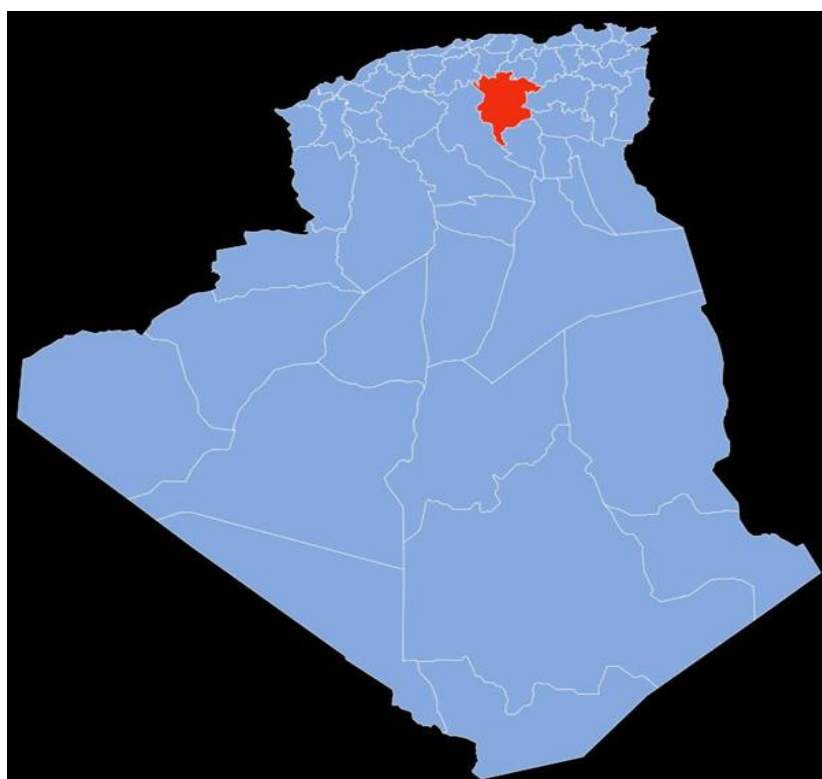
# **Matériels et Méthodes**

Ce travail, étude de l'activité Antifongique, a été réalisées au niveau du Laboratoire de Microbiologie Département de Microbiologie et Biochimie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Mohamed Boudiaf.

### III. Matériel expérimental :

#### III.1 Matériel végétal

La matière végétale utilisé dans cette étude est la partie aérienne de la plante « *Ruta chalepensis* » qui a été récolté à partir de la région de Boussaâda « Djebel Messaad » durant la période de floraison.



#### Coordonnées géographiques

de Boussaâda

Latitude : 35.2193

Longitude : 4.18167

35° 13' 9" Nord,

4° 10' 54" Est

**Figure 7:** Localisation de Bou Saada par rapport à l'Algérie.

#### III.2 Matériels et Produits utilisé :

Béchers, tubes à essais, pipette pasteur, erlenmeyers, flacons, entonnoir, boîtes pétri, Papier filtre stérile, écouvillons, anse de platine, disques en papier stériles (6 mm), Bec Bunsen. Balance, agitateurs, rotavapor, autoclave, étuve, plaque chauffante, bain marie. Eau distillée, méthanol et la solution de DMSO.

### III.3 Microorganismes testés

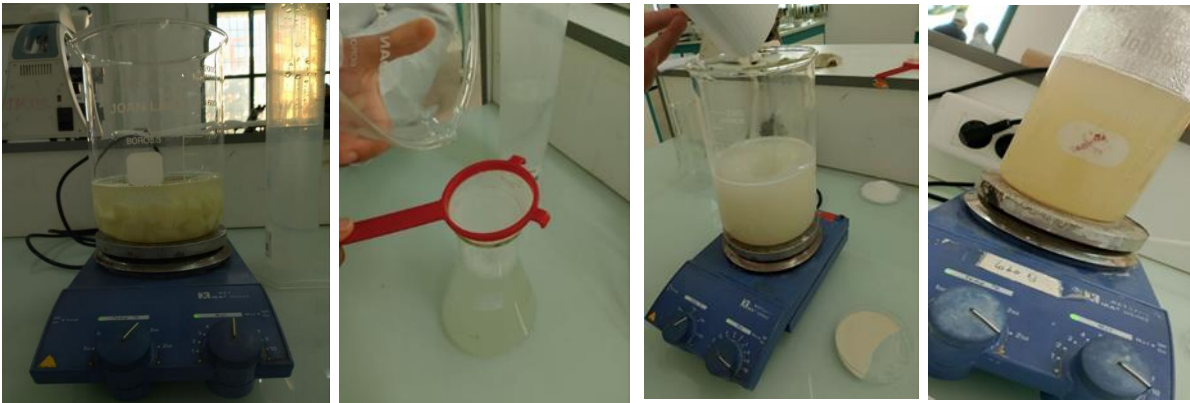
Les tests ont été faits en utilisant 5 champignons filamenteux pathogènes : *Aspergillus Niger*, *Fusarium*, *Penicillium*, *alternaria*, *Rhizopus*.

Ces souches isolées à partir l'orange le fraise et du pain altérer, et sont conservées à basse température.

### III.4 Méthodes :

#### III.4.1 Préparation de milieu de culture PDA

A l'aide d'une balance et coupelle on pèse 20g d'agar et d'extrorse et 200g pomme de terre ; Dans un bicher nous mettons le 200g de pomme de terre et couvrir par l'eau distillé, on laisse, chauffer et agiter pendant 30 min ; On fait la filtration par le papier filtre et l'entonnoir, Ajouter l'eau distillé puis agar et laissez agiter pendant 40 min ; En dernier 3min ajouter l'extrorse et en fin met les dans des flacons étiqueter. (Figure 8)

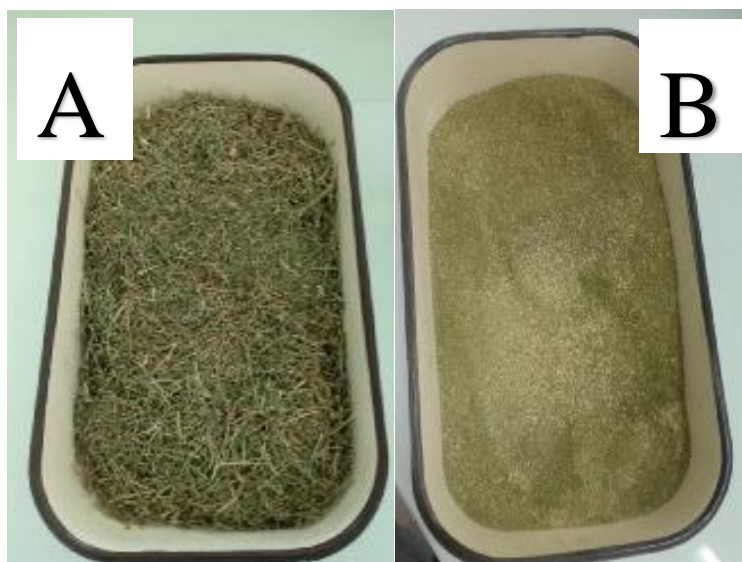


**Figure 8:** Les étapes de préparations de milieu de culture PDA (par nous : BOUCHAALA, CHABIRA et LATRACHE, 2024 ).

#### III.4.2 Préparation d'extrait

- **Préparation de la poudre végétale**

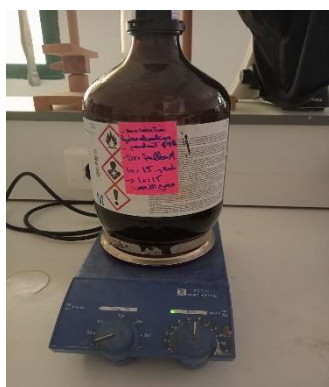
On a broyé les parties aériennes de la plante séchée à l'aide d'un broyeur électrique, puis on les tamisées afin d'obtenir la poudre la plus fine. L'objectif est d'accroître la surface d'échange entre le solide et le solvant afin de faciliter l'extraction. Ensuite, La poudre a été soumise à l'extraction. (Figure 9)



**Figure 9:** Ruta chalepensis avant (A) et après le broyage(B) (par nous-mêmes).

### III.4.3 Extraction par macération

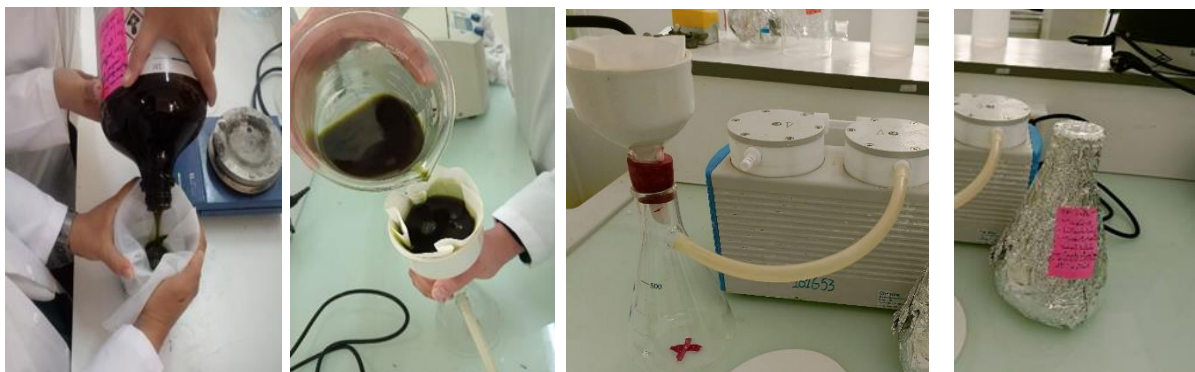
L'extraction est réalisée par la macération, après le séchage et le broyage de la plante, on a pesé 50g de la matière végétale. Cette masse est macérée dans 500 ml d'un mélange méthanol /eau (70/30). Le contenu du flacon est gardé sous agitation pendant 24h à une température ambiante pour dissoudre les constituants solubles. Cette opération est répétée trois 3 fois avec le même solvant après sa séparation par filtration.



**Figure 10:** macération dans l'alcool méthylique pendant 24h au sien de laboratoire de microbiologie de Msila (par nous-mêmes).

- **La filtration**

Le processus de filtration vise à séparer une phase continue (liquide ou gazeuse) des substances solides ou liquides (phase dispersée) qui y sont en suspension. On a appliqué le passage du mélange poudre /solvant sur le filtre en augmentant la vitesse de passage par la pression sur le liquide. On a utilisé deux systèmes de filtrations différents (Emilian Koller) au sein de notre laboratoire de microbiologie, faculté des sciences- M'sila -. (Figure 11)



**Figure 11:** filtration de l'extrait (par nous-mêmes) au sein de notre laboratoire de microbiologie, faculté des sciences- M'sila -.

- **Évaporation par rotavapor**

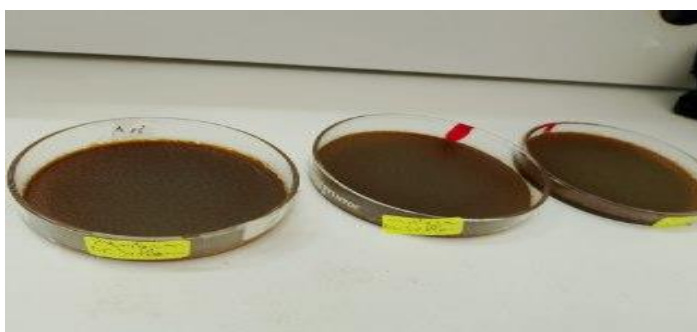
On fait l'évaporation de l'extrait après la filtration finale pour récupérer le méthanol ainsi, récupérer l'extrait brut ; le solvant utilisé lors de cette macération a été récupéré à l'aide d'un évaporateur rotatif de type (BUCHI) à une température de 45°C lors d'une évaporation sous vide.



**Figure 12:** Évaporation d'extrait par rotavapor (par nous-mêmes au sien de labo de microbiologie -m'sila-).

- **Séchage**

L'extrait est mis ensuite dans des boites en verre (7 boites en verre) dans l'étuve pour le séchage à 40°C. (Figure 13)



**Figure 13:** l'extrait brut sèche (par nous-mêmes).

#### **III.4.4 Rendement d'extrait hydro-méthanolique selon Yahyaoui (2005)**

Le rendement est déterminé par le rapport du poids de l'extrait sec après évaporation Sur le poids de la matière végétale sèche utilisée pour l'extraction, multiplié par 100%. Le Pourcentage en extrait brut sec a été calculé par la formule suivante :

$$\mathbf{R \% = M/M0 \times 100}$$

- **R %** : Rendement exprimé en %.

- **M** : Masse en gramme de l'extrait sec résultant.
- **M0** : Masse en gramme du matériel végétal à traiter

$$M=9\div 50g. \quad M=0.18$$

$$R \% = 0.18 \times 100 = 18\%.$$

### **III.4.5 Dosage des polyphénols et flavonoïdes**

#### **III.4.5.1 Dosage des polyphénols totaux**

La méthode de Folin-Ciocalteu a été utilisée pour évaluer la quantité totale de polyphénols présents dans l'extrait brut des feuilles et des tiges de *Ruta chalepensis* (Li *et al.*, 2007). On ajoute 100µl de l'extrait à 0,5 ml du réactif de Folin-Ciocalteu fraîchement préparé (10 fois dilué). Une heure plus tard, on ajoute 400µl de carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) à une teneur de 7,5 %. Il est nécessaire de maintenir l'ensemble à température ambiante et dans l'obscurité pendant 2 heures, puis de le lire à l'aide d'un spectrophotomètre à 765nm. L'équation de régression de la droite d'étalonnage établie avec l'acide gallique préparé dans le méthanol (20-160 µg/ml) a été utilisée pour calculer la concentration totale des polyphénols. On exprime le résultat en microgrammes d'acide gallique équivalent par milligrammes du poids d'extrait (µg EAG / mg).

#### **III.4.5.2 Dosage des flavonoïdes**

Selon Bahorun *et al.*, (1996), la méthode de trichlorure d'aluminium est employée afin de mesurer la quantité de flavonoïdes présents dans l'EBr de *Ruta chalepensis*. La solution d' $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (2% dans le méthanol) est ajoutée à 1 ml d'échantillon ou de standard (préparés dans le méthanol). Après 10 minutes de réaction, on peut mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 430 nm. Une gamme d'étalonnage établie avec la quercétine (1-14 µg/ml) permet de déterminer la concentration des flavonoïdes, qui est exprimée en microgrammes d'équivalent de quercétine par milligramme d'extrait (µg EQ/mg d'extrait).

### **III.4.6 Isolement des champignons**

Des échantillons de fraise, d'orange et de pain altéré ont été collectés à partir des étalages chez les marchands de légumes au marché. (Figure 14).



**Figure 14:** des échantillons altérés par : nous-même.

### III.4.6.1 Méthode d'isolement

Après l'examen visuel des échantillons altérés, oranges, frais et du pain, l'isolement des agents pathogènes a été effectué par le découpage des petits fragments affectés à l'aide d'une lame bistouri (environ 0.5<sup>2</sup> cm le fragment). Après, les différents fragments isolés, ont été transférés directement sur des boîtes de pétri (1 fragments par boîte) contenant le milieu PDA.

L'incubation a été effectuée à une température entre 25°C à 30°C pendant sept jours. Cette période est suffisante pour estimer le début de fructification du champignon.

### III.4.6.2 Purification des souches fongiques

Après 7 jours d'incubation, nous passons à l'étape de purification des cultures. Celle-ci nous permet d'obtenir des cultures pures à partir des différentes colonies isolées.

La surface des boîtes de Pétri contenant le milieu PDA, chaque boîte a été inoculée, à l'aide d'un écouvillon stérile, par une quantité champignons présente dans les boîtes d'isolement précédente.

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 7 jours.

Si une autre souche fongique est contaminée, les souches contaminées sont purifiées en repiquant un disque de 6 mm au centre de la boîte contenant le même milieu et dans les mêmes conditions d'incubation jusqu'à ce que les souches soient pures (Guiraud, 2003).

### III.4.7 L'activité antifongiques

Un test antifongique a été effectué avec l'extrait de *Ruta chalpensis*, en utilisant deux méthodes :

#### III.4.7.1 La méthodes des disques :

Premièrement, différentes concentrations de l'extrait ont été préparées ( 50mg/ml)-(1g/ml)-(1,5g/ml), chaque concentration est testée avec les champignons isolés. En prenant un disque de champignons à partir de chaque souche purifiée, placez-le au centre de la boîte de Petrie qui a été

coulée par le milieu du PDA, ensuite quatre disques sont misent autour du disque de champignon à la même distance ;3 disques sont imbibés par 33 µl d'extrait pour chaque disque alors que le 4<sup>eme</sup> disque est remplis par de l'eau distillé stérile considéré comme un témoin.

L'incubation a été faite à une température de 30 °C pendant 7 jours en mesurant le diamètre des zones de croissance. En même temps, on a mesuré les diamètres de la zone de croissance des mêmes souches fungiques sans extrait.

#### **III.4.7.2 La méthode de l'incorporation de l'extrait dans le milieu**

Dans un flacon de 250 ml de PDA, on ajoute 1000 µl d'extrais, puis on le verse dans des boîtes de pétri. Au centre de chaque boîte de pétri, on place les disques de champignons. L'incubation se déroule à une température de 30 °C pendant une période de 7 jours.

Pendant les 7 jours, les résultats ont été prise en mesurant le diamètre des zones de croissance.

# **Résultats et Discussions**

### III.5 Résultats et discussion

#### III.5.1 Extraction

##### III.5.1.1 Rendement des extraits sec

Le résultat de cette expérimentation a permis l'obtention d'un extrait de *Ruta chalepensis* d'un aspect gélatineux et d'une couleur vert foncé après l'évaporation de l'eau ou le rendement était de 18% (Tableau 01).

**Tableau 1:** Rendement (%) aspect et couleur de l'extrait brut sec de *Ruta chalepensis*.

L'extrait	Aspect	Couleur	Pois de résidu sec(g)	Poids de l'extrait sec (g)	Rendement
EMeOH	Gélatineux	Vert foncées	50	09	18%

Les résultats montrent que le rendement de notre extrait hydrométhanolique est le double (18 %) par rapport à celui de l'extrait méthanolique qui a été trouvé par une étude effectuée par (Bencheikh et Boutchicha ,2017) 9%.

Selon une autre étude réalisée par Mansour et Said *et al.*,1990 sur la même espèce, le rendement était 3,75 % ce qui est un peu inférieur par rapport à le nôtre, une étude réalisée sur la même plante de la région de bordj bouareridj a mentionné une valeur de 20,83%, cette valeur plus proche de la nôtre 18%.

Cette différence entre les rendements des extraits de *Ruta chalepensis* peut être attribué à la différence entre les régions -BBA et BOUSSADA- de récolte ; aussi la polarité du système de solvant d'extraction hydrométhanolique qui est plus élevée que celui d'un extrait méthanolique, ce qui peut refléter la différence entre notre rendement (18 %) et celui de (Bencheikh et Boutchicha ,2017) qui été (9,62 %).

#### III.5.2 Dosage des polyphénols et flavonoïdes

L'extraction par un système hydroalcoolique permet la récupération de quelques substances active à partir de la plante, parmi ses composés on peut trouver les poly phénols et les flavonoïdes ; qu'on peut les dosé par des méthodes colorimétriques.

Les composés phénoliques forment le groupe des composés phytochimiques le plus important des plantes (Beta *et al.*, 2005) et comme la majorité des effets biologiques des plantes dû à ces substances, et qui sont l'un des principaux contributeurs à l'activité antioxydante et antifongique (Harbone et Williams, 2000), le dosage des polyphénols totaux et des flavonoïdes d'extrait brut de *Ruta chalepensis* a été effectué.

### III.5.2.1 Teneur en polyphénols totaux

La teneur en polyphénols totaux des extraits a été estimée par la méthode de Folin-Ciocalteu (Li *et al.*, 2007), qui a été choisie pour les raisons suivantes :

- C'est une méthode qui satisfait aux critères de faisabilité et de reproductibilité.
- La méthode est bien standardisée.
- La grande longueur d'onde (765nm) d'absorption du chromophore permet de minimiser les interférences avec la matrice d'échantillon qui est souvent coloré.
- C'est un test largement pratiqué dans les laboratoires de recherche à travers le monde (Huang *et al.*, 2005).

La courbe d'étalonnage, de l'acide gallique, obtenue montre une linéarité de l'absorbance en fonction des concentrations (Figure 15). La quantité de polyphénols a été exprimée en  $\mu\text{g}$  EAG / mg d'extrait et déterminés par l'équation de type :  $y = ax + b$ .

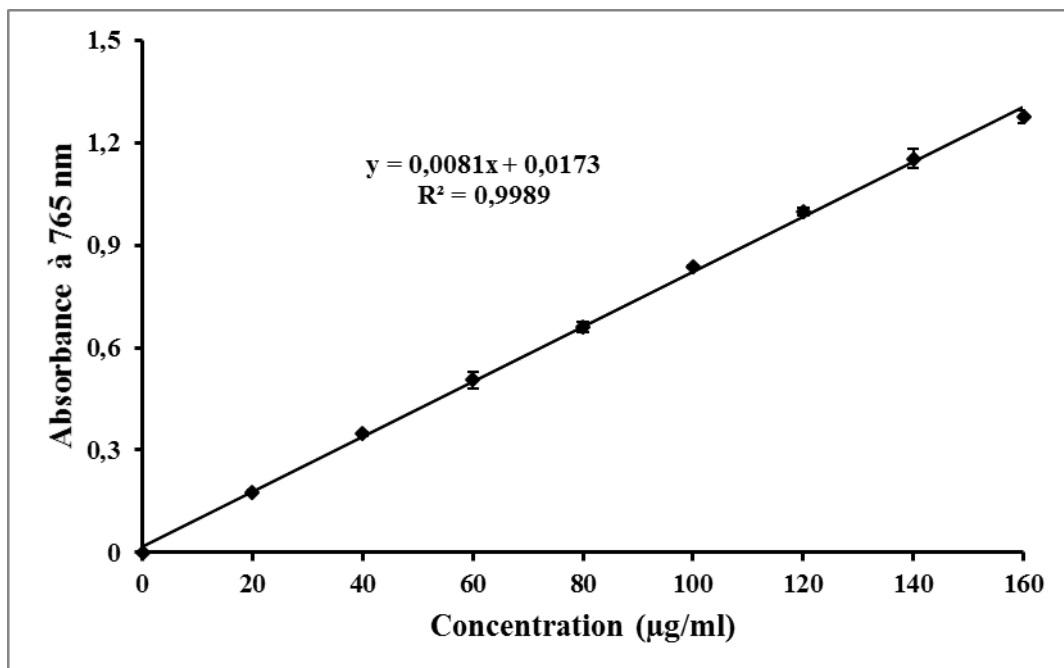


Figure 15: Droite d'étalonnages de l'acide gallique (par nous-même ).

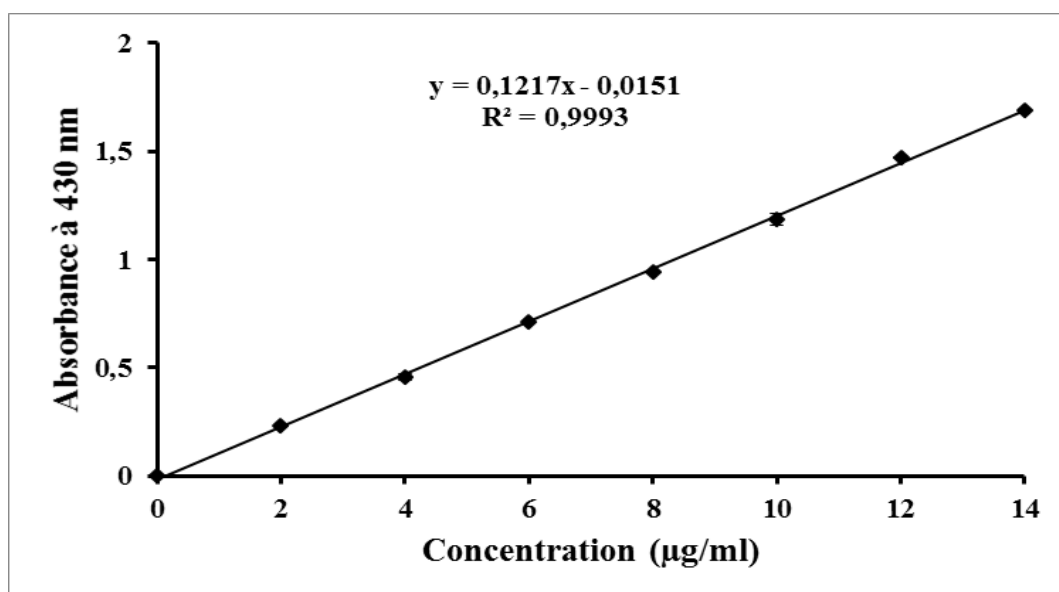
L'extrait brut de *Ruta chalepensis* a montré une teneur considérable en polyphénols (**Tableau 2**).

**Tableau 2:** Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes dans les extrais de la plante *Ruta chalepensis*

Extrait	Teneur en polyphénols μg EAG/mg d'extrait.	Teneur en flavonoïdes μg EQ/mg d'extrait
EBr	108,60± 11,34μg	9,72± 0,60μg

### III.5.2.2 Teneur en flavonoïdes

Les flavonoïdes sont des polyphénols naturels les plus importantes (Djeridane *et al.*, 2010). La méthode de détermination quantitative des flavonoïdes totaux-méthode du trichlorure d'aluminium, est une méthode simple, peu coûteuse et offrent une sensibilité ce qui la rende plus pratique. En outre, cette méthode permet de déterminer la teneur totale en flavonoïdes même en présence d'autres composés polyphénoliques qui ne forment pas des complexes avec AlCl<sub>3</sub> (Matyushchenko et Stepanova, 2003). La teneur en flavonoïdes est exprimée en équivalent microgramme de quercétine par milligramme d'extrait (μg EQ/mg d'extrait) en se basant sur une courbe d'étalonnage en utilisant la quercétine comme un modèle de flavonoïdes (**Figure 16**).



**Figure 16:** Droite d'étalonnages de la quercétine (par nous-même).

Les résultats ont montré que EBr de *Ruta chalepensis* représente une teneur considérable en flavonoïdes de  $9,72 \pm 0,60 \mu\text{g EQ /mg}$  d'extrait.

De nombreuses études ont été réalisées pour comprendre le mécanisme d'action des extraits de plantes. Plusieurs chercheurs attribuent cette action aux composés phénoliques, qui peuvent interférer avec les biomembranes, causer des dommages cellulaires, provoquer la fuite de matériaux cellulaires et, finalement, entraîner la mort des microorganismes (Mshvildadze *et al.*, 2000 ; Veldhuizen *et al.*, 2006 ; Abdel Ghani *et al.*, 2008). Ce mécanisme pourrait expliquer comment la croissance mycélienne est réduite ou totalement inhibée par les extraits, qui agissent sur la fonctionnalité et la structure de la membrane cellulaire.

Notre valeur était  $=108,6 \mu\text{g EQ /mg}$  cette valeur représente le double de la valeur trouvée par Bouajila *et al.*, (2013). Qui ont travaillé sur la même plante mais utilisant l'éthanol comme système d'extraction ce qui reflète que le système d'extraction joue un rôle dans la quantité des polyphénols

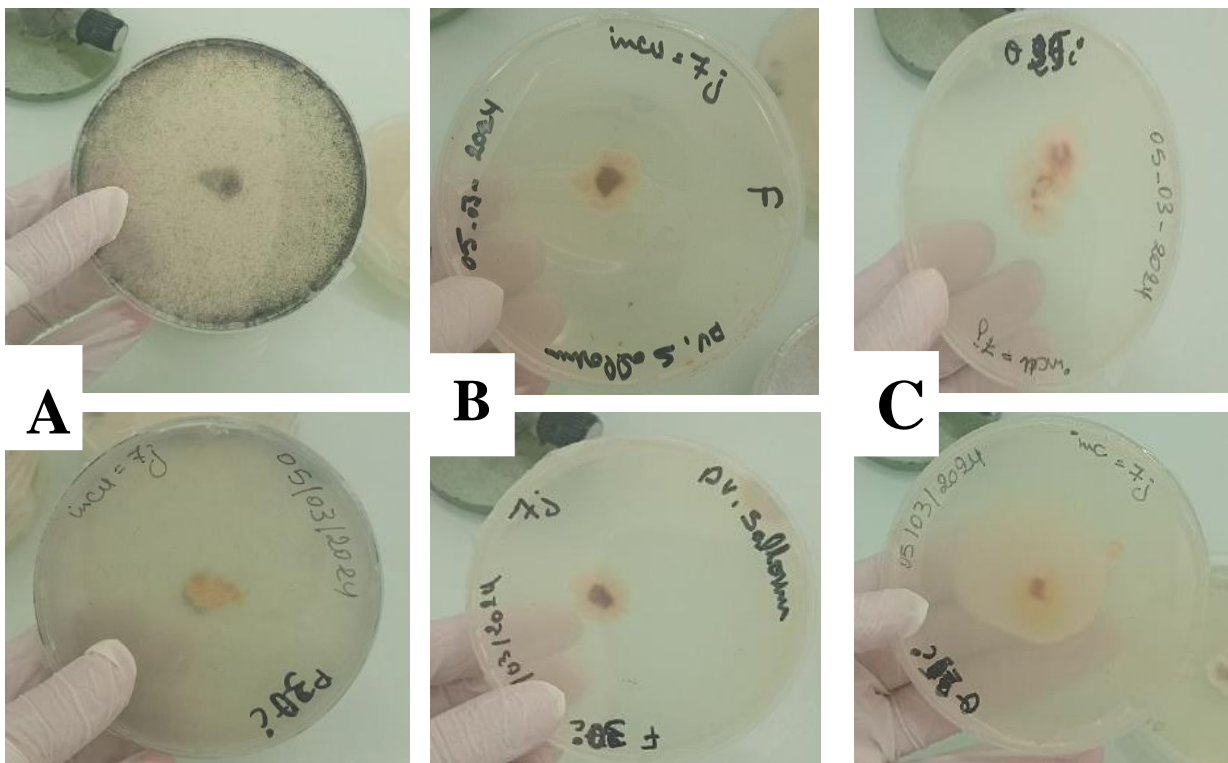
Il convient de noter que l'emploi de plantes d'espèces géographiques et climatiques différentes, ainsi que des techniques d'extraction et de dosage différentes, diminue la fiabilité d'une comparaison entre les différentes études.

L'estimation quantitative des polyphénols totaux et flavonoïdes par la méthode de Folin Ciocalteu et la méthode de trichlorure d'aluminium on conclue l'étude effectuée par des étudiants de master à l'université de Bordj Bou Arreridj sur le même espèce *Ruta chalepensis* qui ont estimés des mentionnés des valeurs de  $160,21 \pm 7,29 \mu\text{g EAG /mg}$  d'extrait et  $17,97 \pm 0,05 \mu\text{g EQ /mg}$  d'extrait respectivement, ses valeurs sont un peu élevées en comparaison avec notre au *Ruta chalepensis* de Boussaâda.

### III.5.3 Isolement et identification des souches fongiques

Notre étude de l'activité antifongique nécessite un isolement et une identification des souches fongiques à partir des aliments altérés par ses derniers, pour cela on a récupéré quelques aliments qui sont : les oranges, les fraises et le pain.

L'isolement des champignons nous a permis d'avoir une variété des souches avec différents aspects macroscopiques à partir de chaque échantillon (Figure 17) :



**Figure 17:** Resultat de la fructification des champignons

A : à partir du pain. B : à partir de fraise .C : à partir d'orange

Selon nous : BOUCHAALA, CHABIRA ET LATRACHE.

**A :** Des Colonies duveteuses ave mycélium arien de Couleur au recto : blanche-grise jusqu'à noir au bordure / gris foncée (sporulation) Reste pâle au verso.

**B :** Une colonie gélatineuse de couleur verte pistache au centre et blanc au périphérique, le revers est blanc à crème.

**C :** Des colonies blanchâtres à crème, de teinte beige à brun, le verso jaune à brun.

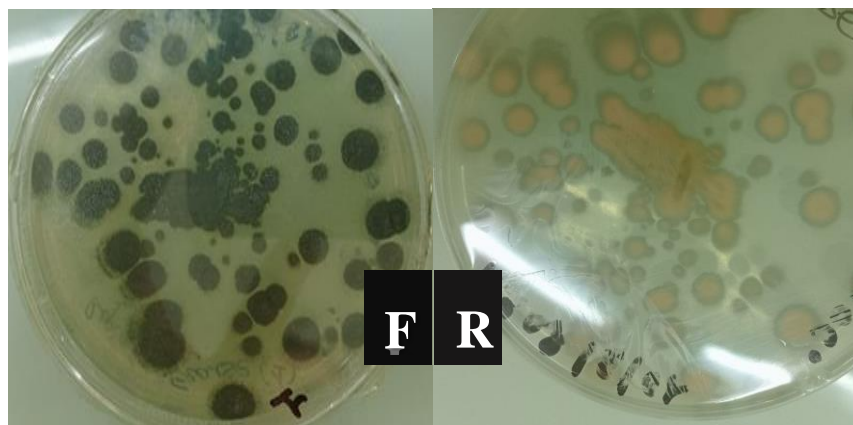
**Remarque :** l'identification des champignons isolées selon monsieur Dr Hendel N.

La purification des souches pure est basé sur le repiquages répété sur milieu PDA de chaque croissance fongique ; jusqu'à l'obtention des souches pures destinés au testes. (Guiraud, 2003)

Ensuite la purification est basée, en premier lieu, de reconnaître un champignon comme appartenant à un genre, qui est un groupe d'organismes reliés entre eux par des caractéristiques communes (Cahagnier, 1998). D'après Barnett et Hunter (1972), en se référant aux caractéristiques macroscopiques (couleur, forme de colonie et revers des boîtes...) des souches fongiques isolées, nous avons repéré plusieurs genres sur le milieu PDA : Un nombre total de 5 isolats de moisissures a été mentionnés à partir des six boitesensemencées : Pénicillium, Alternaria, Aspergillus Niger et Fusarium, Rhizopus.

- **Penicillium**

Colonies sur PDA 5-12mm de diamètre. Ces colonies poudreuses, de couleur vert foncé, revers jaune pale. Avec des bordures verdâtres, leur croissance est moyenne (Figure 18).

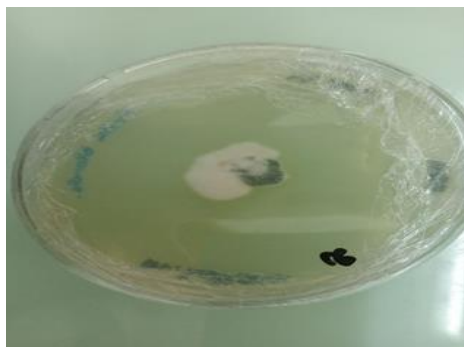


**Figure 18:** penicillium. (F=face et R=revers)

Par nous : BOUCHAALA, CHABIRA et LATRACHE,2024

- **Alternaria**

Colonies sur PDA de 6-13 mm de couleur blanc-gris au recto et un verso vert foncé, Ce champignon pousse doucement. (Figure 19)

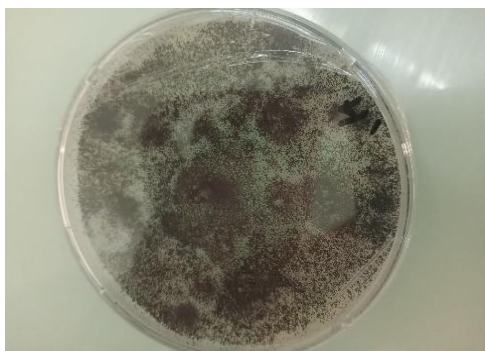


**Figure 19:** Alternaria.

Par nous : BOUCHAALA, CHABIRA ET  
LATRACHE,2024

- **Aspergillus**

Colonies sur PDA de 65-75 mm de diamètre remplissant la boîte de pétri, noire et frisées, revers pale voire jaune clair La croissance de ce champignon est un peu lente 5 à 7 jours. (Figure 20)



**Figure 20:** Aspergillus Niger.

Par nous : BOUCHAALA, CHABIRA et  
LATRACHE,2024

- **Fusarium**

Colonies sur PDA 80-90mm de diamètre couvrant la boîte de pétri, mycélium blanc floconneux blanche au centre et à la périphérie, au verso : pourpre au centre et crème à la périphérie, la Croissance de ce champignon est rapide. (Figure 21)



Figure 21: Fusarium Par nous : BOUCHAALA, CHABIRA et LATRACHE,2024

#### • Rhizopus

Ce champignon forme des colonies supérieures à 50mm de diamètre couvrant la boîte de Pétri duveteuse, blanchâtre. Le mycélium est lâche, extensif, cotonneux devenant brun-noir à maturité. (Figure 22)

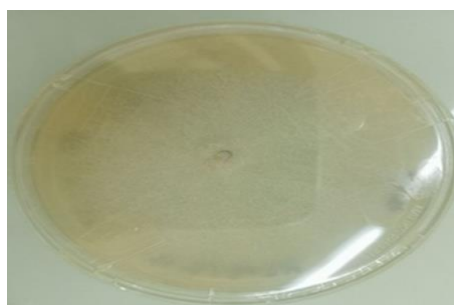


Figure 22 : Rhizopus Par nous : BOUCHAALA, CHABIRA et LATRACHE,2024

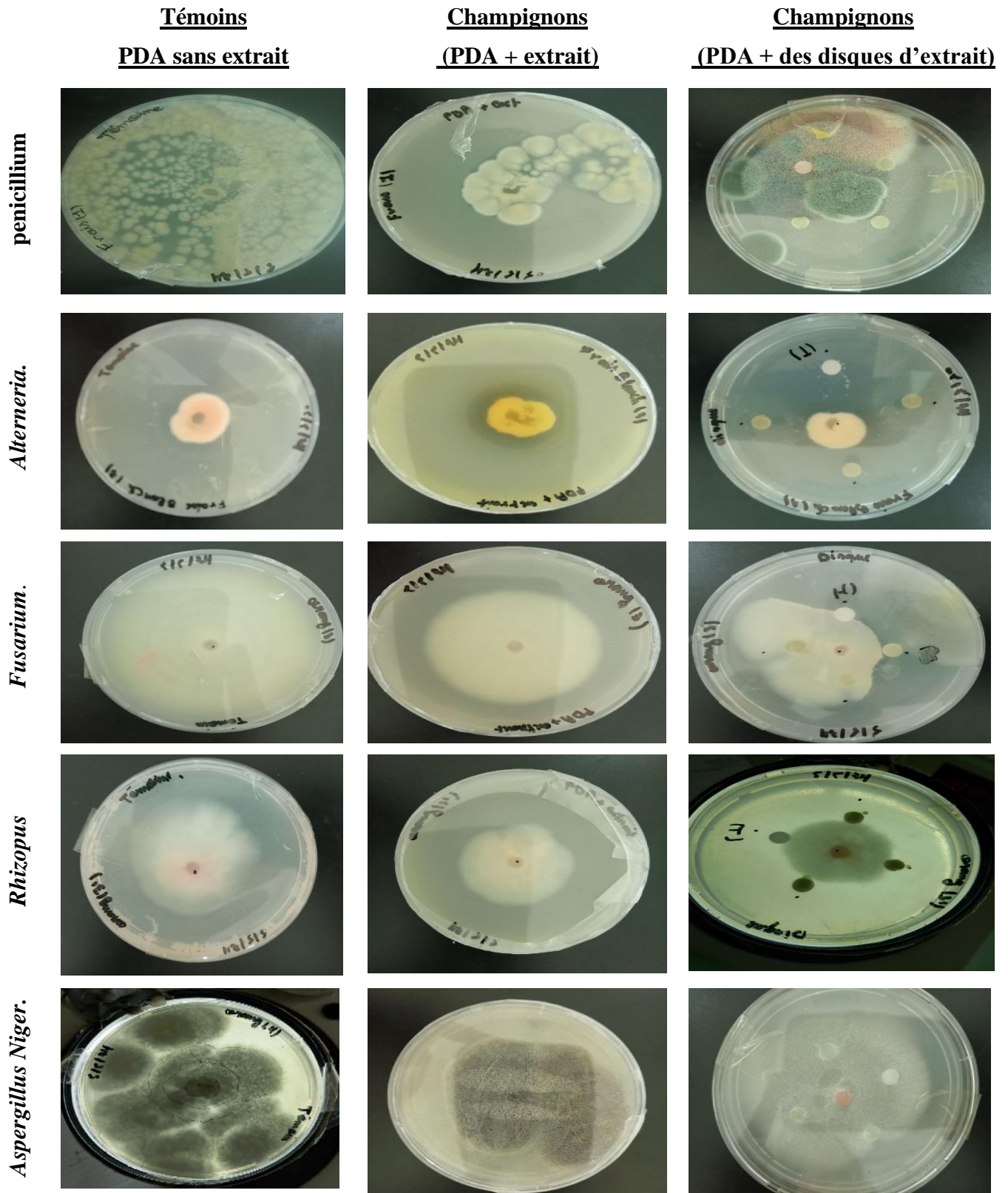
Nos résultats de purification et identification étaient similaires à ceux mentionnés par Hendel *et al* 2017 pour la plupart des champignons, penicillium, alternaria, aspergillus et fusarium. Si la croissance est déroulée sur le milieu PDA. En se basant sur l'aspect macroscopique.

On a trouvé des difficultés pour l'identification vue le manque des milieux de culture spécifique pour l'identification tel que CYA, MEA et G25N ; aussi le manque de l'observation microscopiques des conidies

#### III.5.4 Test d'activité antifongique

L'activité antifongique de l'extrait de la plantes étudiées a été évaluée par deux méthodes : méthode des disques et la méthode de l'incorporation de l'extrait au milieu de culture. La croissance radiale de chaque champignon soumis à l'effet de concentrations progressives de l'extrait de Ruta chalpensis a été mesurée quotidiennement et comparée à celle du témoin. Le pourcentage d'inhibition est calculé au 7ième jour pour les deux techniques appliquées. Ont obtenus ses résultats après 7 jours d'incubation dans un température 30C°.

##### III .5.4.1 Mesure de pourcentage d'inhibition de la croissance



**Figure 23:** Activité antifongique de l'extrait d *Ruta chalepensis* sur les isolats fongiques.

Par nous : BOUCHAALA, CHABIRA et LATRACHE,2024

L'extrait de *R. chalepensis* a exercé une activité inhibitrice vis-à-vis tous les champignons testés : *Fusarium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Rhizopus* et *Penicillium*, mais a des pourcentages différents

On a remarqué que la croissance mycélienne décroît d'une manière un peu remarquable vis-à-vis de la dose et des méthodes : extrait incorporé au milieu (1000 µl d'extrait dans 250 ml de PDA) et méthode des disques (33 µl d'extrait pour chaque disque).

La zone des inhibitions dans les boîtes de pétrie qui contient les disques imbibés par l'extrait est plus large que celle des inhibitions dans les boîtes de pétrie qui contiennent l'extrait incorporé au milieu.

Cela est dû au fait que la concentration est diluée pour la méthode de l'incorporation de l'extrait au milieu, alors que la concentration de la méthode des disques est plus concentrée avec celle-là.

**Tableau 3:** Diamètre de croissance Mycélienne au 7<sup>em</sup> jours(mm).

	Diamètre (mm) <b>TEMOINS</b>	Diamètre(mm) <b>EIM</b>	Diamètre(mm) <b>EID</b>
<b>Aspergillus Niger</b>	58	50	40
<b>Fusarium</b>	45	30	35
<b>Rhizopus</b>	30	28	27
<b>Penicillium</b>	25	24	20
<b>Alternaria</b>	23	22	20

Le plus grand diamètre de croissance mycélien a été enregistré chez aspergillus Niger et Fusarium en absence d'extrait (témoin) avec un diamètre de croissance de 58mm et 45mm respectivement, alors que le diamètre de croissance en présence d'extrait soit sous forme de disque imbibé (EID) ou sous forme extrait incorporer au milieu (EIM) a des concentration différente (50 mg/ml ,1 g/ml et 1,5g/ml) était moins que celui en absence d'extrait.

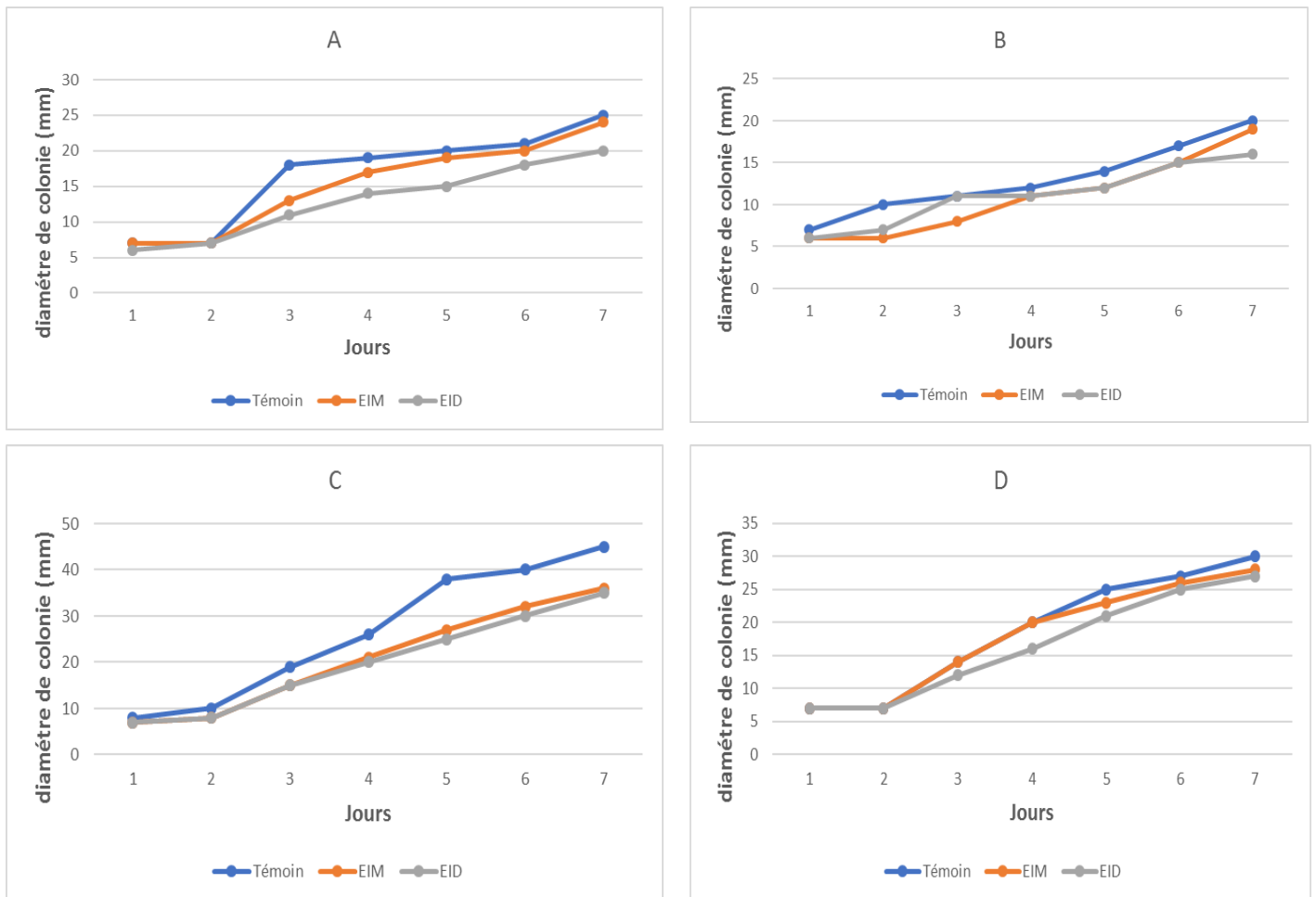
**Tableau 4:** pourcentage d'inhibition des champignons en présence d'extrais EIM et EID

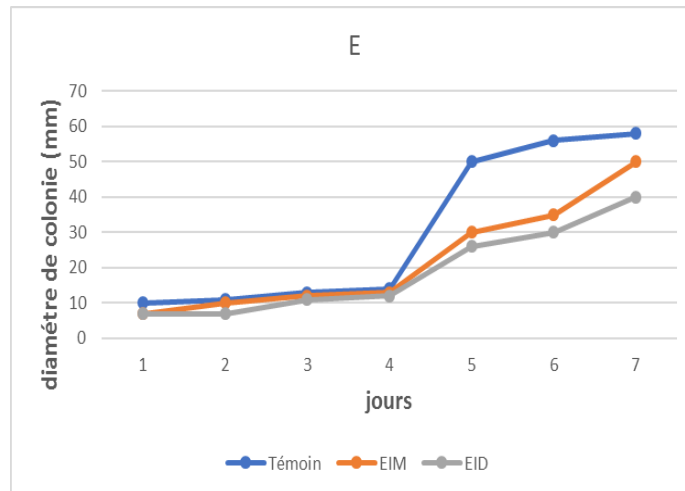
	Pourcentage d'inhibition %	
	EIM	EID
Penicillium	4%	20%
Alternariat	5%	20%
Fusarium	20%	20%
Rhizopus	6 ,66%	22,22%
Aspergillus Niger	13,79%	31 ,03%

Le pourcentage d'inhibition des champignons est plus élevé pour l'EID : extrait imbibé au disque par rapport à celui remarqué le EIM : extrait incorpore au milieu (le tableau04).

### III.5.4.2 La croissance fongique en présence et en absence d'extrait

La croissance des colonies du champignons a été poursuivie pendant sept jours, les diamètres de croissance ont été mesuré chaque jour (mm) et les résultats sont exprimés sous forme de courbe, en présence d'extrait et en l'absence. (Figure 24)





**Figure 24:** Croissance des champignons sur le Milieu PDA dans les trois situations : Témoins, extrait imbibé dans les disques (EID), extrait incorporer dans le milieu (EIM) pour le Pénicillium (A), alternaria(B), Fusarium (C), Rhizopus(D) aspergillus Niger (E).

On a remarqué qu'à partir du quatrième jour il y a une différence significative dans les mesures du diamètre et presque tous les champignons sont ralentis sous l'effet de la présence de l'extrait mais avec de proportions variables soit en utilisant la méthode EID : extrait imbibé aux disques ou bien la méthode EIM : extrait incorporer au milieu. Le pourcentage d'inhibition était calculé au 7 -ème jour ; d'une manière générale EID a présenté des % supérieur à celui trouvé par EIM vis à vis quatre champignons : Penicillium, Alternaria, Rhizopus et Aspergillus, alors qu'il été similaire pour Fusarium, l'explication de ses résultats peut être due à la composition chimique des structures cellulaires de chaque champignon et à la méthode utilisée et aussi aux concentrations des extraits.

# **Conclusion**

- **Conclusion**

À travers ce travail et selon les résultats obtenus, on peut conclure que *Ruta chalepensis* possède une grande richesse en métabolites secondaires et contient une diversité de molécules biologiquement actives.

La plante de *Ruta chalepensis* riche en polyphénols, d'après les résultats il peut être confirmé qu'il existe un effet inhibiteur sur les types de champignons étudiés (*Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Rhizopus*). Donc on doit développer des produits à base de plantes pouvant servir d'alternatives aux produits de synthèse pour combattre les agents pathogènes.

Perspectives : des travaux complémentaires doivent être réalisés

Etude approfondie sur d'autres souches fongiques

Dosage d'autres composés phytochimiques

Détermination des structures chimiques des composants

# Référence

---

## Référence

- Meyer et al., (2004).
- Djaffar, Zenati, (2020).
- Duke et al., (2008)
- WIART, (2006) ; BONNIER, (1999) ; TAKHTAJAN, (2009).
- Le moine, 2001.
- Bel Bachir et Tchenar, 2019.
- Bock, 2011.
- Yahyaoui (2005)
- Tounsi et al, 2011
- Lièvre, (2004).
- Gunaydin et al., (2005).
- Lamnauer et Batanouny, (2005).
- Bilderback, (2007).
- Judd et al., (2002).
- Lutge et al., (2002) ; Abderrazak et Joël., (2007)
- Vermerris, (2006).
- Lugasi et al., (2003).
- Lebham, (2005).
- Seyum et al., (2006).
- Havsteen, (2002).
- Medic Sanic et al., (2004).
- Koji et al., (2001) ; Masayuki et Katsuya, (2010).

- Pane et al., (2011).
- Ayesha et al., (2003).
- Nguyen, (2007).
- Yadav et al., (2018).
- Kochkouch et al., (2012).
- Kim et al (2007).
- Lepoivre, (2003).
- Jeunot, (2005) ; Heit, (2015).
- Chabasse et al., (2002) ; Sumerell et al., (2003).
- Ferdi khaoula et al., (2022).
- BrainKart and Dr. Gary E. Kaiser
- Paccoud et al., (2022).
- Hamia et al., (2014).
- Li et al., (2007)
- Bahorun et al., (1996)
- Guiraud, (2003).
- Beta et al., (2005)
- Harbone et Williams, (2000).
- Li et al., (2007).
- Huang et al., (2005).
- Djeridane et al., (2010).
- Matyushchenko et Stepanova, (2003).
- Mshvildadze et al., 2000 ; Veldhuizen et al., 2006 ; Abdel Ghani et al., 2008.

- Mansour et Said et al.,1990
- Bencheikh et Boutchicha ,2017.
- Bouajila et al., (2013).
- (Guiraud, 2003)
- Cahagnier, 1998.
- Barnett et Hunter (1972)