

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE MOHAMED BOUDIAF - M'SILA

FACULTE : SCIENCE
DEPARTEMENT : SCIENCE DE
LA NATURE ET DE LA VIE
N°:.....



DOMAINE : S.N.V
FILIERE : BIOLOGIE ET
PHYSIOLOGIE VEGETAL
OPTION : BIOTECHNOLOGIE
VEGETAL

Mémoire présenté pour l'obtention
Du diplôme de Master Académique

Par : - BENATTIA Zinelabidine
- MESSAOUDI Sidali

Intitulé

**Etude de Les activités antimicrobiennes et
dosage des composés phénoliques des extraits
de terfez (*Terfezia arenaria*. Chatin)**

Soutenu devant le jury composé de:

Dr. YAHIAOUI Merzouk	MCD	Université de M'sila	Président
Dr. BENDIF Hamdi	MCD	Université de M'sila	Examineur
Dr. HRRAR Nacer	MCD	Université de M'sila	Examineur
Dr. HARIR Mohamed	MCD	Université de M'sila	Promoteur

Année universitaire : 2017/2018

Remerciements

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de m'avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

Nos vifs remerciements s'adressent à tous les membres du jury : nous vous remercions vivement le Dr. YAHIAOUI Merzouk de nous avoir fait l'honneur de présider le jury de ce mémoire.

Nous remercions notre examinateur Dr. BENDIF Hamdi pour nous avoir fait l'honneur d'accepter d'examiner ce modeste travail.

Nous désirons exprimer nos gratitude à notre encadreur Dr. HARIR Mohamed, pour nous avoir guidé dans la réalisation de ce travail, par sa patience, ses conseils précieux et ses critiques constructives a su nous mettre sur la bonne voie.

Nos remerciements à tous nos Professeurs, doctorants, techniciens de laboratoires, camarades de classe et personnels du département de Biologie pour leurs contributions à notre réussite.

Nous remercions nos parents pour le soutien inconditionnel dont ils ont fait, merci pour le soutien financier, moral, psychologique et matériel. Si je suis ici aujourd'hui, c'est grâce à vous!

Nous souhaitons aussi remercier nos frères, nos sœurs et nos beaux-frères pour leur accompagnement durant ces deux années et leur soutien sans faille.

Nous remercions également toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont participé à

L'élaboration de ce mémoire.

Enfin, Nous remercions nos amis et camarades de promotion pour ces années passées ensemble, dans les meilleurs moments comme dans les pires.

Sidali & Zinelabidine

Dédicace

Avec les sentiments de la plus profonde humilité je dédie ce modeste travail :

A mon cher père Tahar qui m'a toujours soutenu, qui a sacrifié sa vie pour notre bien, qui s'est privé de tous pour répondre à nos besoins. Aucun mot ne saurait exprimer tout mon amour, ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

A ma chère mère Djdia celle qui m'a donné la vie, à la lumière de mon âme, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, merci pour votre présence dans les moments qui m'étaient les plus difficiles.

A ma chère fiancée

Sans toi, je n'en serai pas là aujourd'hui. Merci pour ton soutien.

A mes chers frères Ramzi et Abdenaser, je vous souhaite tout le bonheur et la réussite du monde.

A ma chère sœur Fatima, que dieu vous procure santé et Bonheur durant toute votre vie.

A mon encadreur : Dr .HARIR les mots ne suffisent guère pour exprimer mes remerciements pour votre patience, vos conseils précieux et critiques constructives, je vous souhaite une vie pleine de bonheur.

A mon Enseignant : Dr .BENDIF Hamdi pour tout le soutien, l'aide, l'orientation, la guidance qu'elle m'a apporté.

A toutes mes amies et à tous ceux qui m'ont aidé à mettre au point ce travail.

Sidali

Dédicace

Avec les sentiments de la plus profonde humilité je dédie ce modeste travail :

A mon cher père Rabah qui m'a toujours soutenu, qui a sacrifié sa vie pour notre bien, qui s'est privé de tous pour répondre à nos besoins. Aucun mot ne saurait exprimer tout mon amour, ma gratitude et ma profonde reconnaissance.

A ma chère mère Horia celle qui m'a donné la vie, à la lumière de mon âme, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, merci pour votre présence dans les moments qui m'étaient les plus difficiles.

A mes chers frères Ahmed, Khaled, Bilal et Abderrahman, je vous souhaite tout le bonheur et la réussite du monde.

A mes chers sœurs Fatima, Aicha, Messaouda et Zineb, que dieu vous procure santé et Bonheur durant toute votre vie.

A mon encadreur : Dr .HARIR les mots ne suffisent guère pour exprimer mes remerciements pour votre patience, votre conseils précieux et critiques constructives, je vous souhaite une vie pleine de bonheur.

A mon Enseignant : Dr .BENDIF Hamdi pour tout le soutien, l'aide, l'orientation, la guidance qu'elle m'a apporté.

A toutes mes amies et à tous ceux qui m'ont aidé à mettre au point ce travail.

Zinelabidine

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC : **A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection

CCM : **C**hromatographie sur **C**ouche **M**ince

DMSO : **D**i**M**éthyl**S**ulf**O**xide

DO : **D**ensité **O**ptique

E° : point de polarité

G : **G**rossissement

GN : **G**élose **N**utritive

Jc : **J**urassic

MeOH : **M**éthanol

MH : **M**ueller-**H**inton

PDA : **P**otato **D**extrose **A**gar

pH : **p**otentiel **H**ydrogène

RF : **R**apport **F**rontal

sp : **s**pecies (espèce).

UV : **U**ltra-**V**iolet

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Cycle biologique des truffes du désert	8
Figure 2. hétérocaryotique (à noyaux appareillés) originaire de la germination de veines stériles de la glèbe de <i>Terfezia pfeilii</i> ; (B) Hyphes homocaryotique originaires de la germination d'une seule spore de <i>Terfezia pfeilii</i> ; (C) Hyphe hétérocaryotique originaire de la germination des veines stériles de la glèbe de <i>Terfezia boudieri</i> ; GX1000.	9
Figure 3. Différents stades de développement de quatre primordiums de <i>Terfezia arenaria</i> en relation avec les racines d' <i>Helianthemum guttatum</i> (GX2) ; (B) Morphologie du primordium le plus développé en relation avec les racines mycorhizées d' <i>H.guttatum</i> (Gx10).....	11
Figure 4. Primordium de <i>Tuber melanosporum</i> , les flèches indiquent les filaments mycéliens reliant primordium et ébauche ; (a) : ascogone ; (f) : filaments recouvrants ; (t) : trichogyne ; Echelle : 10 µm.....	11
Figure 5. Ascospore de <i>T. arenaria</i> (Moris) Trappe de la station de Zeriguet (Wilaya de Saïda) montrant les verrues cylindriques tronquées au sommet, observée au microscope électronique à balayage Gx 3240	14
Figure 6. Squelette de base des flavonoïdes.....	17
Figure 7. Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïde.....	18
Figure 8. Préparation le réactif de Melzer	22
Figure 9. Le protocole d'Extraction par macération dans le méthanol	28
Figure 10. Représentation schématique d'un extracteur Soxhlet.....	27
Figure 11. Le protocole d'Extraction au soxhlet dans le dichlorométhane.....	28
Figure 12. Les déférentes concentrations des extraits dilués de (M) macération et (S) soxhlet30	
Figure 13. Les déférents Systèmes des solvants utilisés dans les séparations par (CCM).....	31
Figure 14. L'ascocarpe de déférente forme de terfez.....	35
Figure 15. Périidium de <i>Terfezia arenaria</i>	40
Figure 16. Coupe transversale de <i>Terfezia arenaria</i> sous la loupe binoculaire	43
Figure 17. Coupe transversale de <i>Terfezia arenaria</i> sous la loupe binoculaire	41
Figure 18. Mesure précise de l'ascocarpe de la terfez	42

Figure 19. Morphologie des ascocarpes de <i>Terfezia arenaria</i> (P) a Périidium noir foncé et (G) à gléba rose	42
Figure 20. Morphologie des ascospores de la <i>Terfezia arenaria</i> fraîche Gx 40 (photo original)	43
Figure 21. Morphologie des ascocarpes et des asc et les ascospores de Terfez noir <i>Terfezia arenaria</i> (D) Diamètres de l'asc et l'ascospore de <i>Terfezia arenaria</i> desséchées Gx 40 et (F) Diamètres de l'asc et l'ascospore de <i>Terfezia arenaria</i> fraîche Gx 40	43
Figure 22. Coloration des asques de <i>Terfezia arenaria</i> par réactif de Melzer en différents temps	44
Figure 23. L'aspect des extrais obtenus par l'extraction par (M) macération et (S) soxhlet .	44
Figure 24. Histogramme représente diamètres d'inhibitions de l'activité antibactérienne de Différentes concentrations de l'extrait brut obtenu par méthode de macération..	45
Figure 25. l'activité antibactérienne <i>Escherchia coli</i> . ATCC 25922	46
Figure 26. l'activité antibactérienne <i>Pseudomonas aerogenosa</i> . ATCC 23853	48
Figure 27. l'activité antibactérienne <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	49
Figure 28. l'activité antibactérienne <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	49
Figure 29. l'activité antibactérienne <i>Salmonella entarica</i> . ATCC 14028.....	49
Figure 30. Histogramme représente diamètres d'inhibitions de l'activité antifongique de Différentes concentrations de l'extrait brut obtenu par méthode de macération	50
Figure 31. l'activité antifongique <i>Aspergillus niger</i>	51
Figure 32. l'activité antifongique <i>Pinicillium</i>	51
Figure 33. l'activité antifongique <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	33
Figure 34. Histogramme représente diamètres d'inhibitions de l'activité antibactérienne de Différentes concentrations de l'extrait obtenu par extraction par Soxhlet.....	52
Figure 35. l'activité antibactérienne <i>Escherchia coli</i> . ATCC 25922	53
Figure 36. l'activité antibactérienne <i>Pseudomonas aerogenosa</i> . ATCC 23853	53
Figure 37. l'activité antibactérienne <i>Staphylococcus aureus</i> . ATCC 25923	53
Figure 38. l'activité antibactérienne <i>Enterococcus faecalis</i> . ATCC 61299.....	53

Figure 39. Histogramme représente diamètres d'inhibitions de l'activité antifongique de Différentes concentrations de l'extrait obtenu par extraction par Soxhlet.....	54
Figure 40. l'activité antifongique <i>Aspergillus niger</i>	55
Figure 41. l'activité antifongique <i>Pinicillium</i>	55
Figure 42. l'activité antifongique <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	55
Figure 43. l'activité des antibiotiques <i>Salmonella entarica</i> ATCC 14028	56
Figure 44. l'activité des antibiotiques <i>Pseudomonas aerogenos</i> ATCC 23853.	56
Figure 45. l'activité des antibiotiques <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	57
Figure 46. l'activité des antibiotiques <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 61299	57
Figure 47. l'activité des antibiotiques <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	57
Figure 48. l'activité des antibiotiques <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	57
Figure 49. Résultats de la séparation des dévers substances de l'extrait (M) macération et l'extrait de (S) soxhlet, avec des déférents mélanges des solvants (DA) (AME) (AFE) (CM) (DM) (AB) respectivement par la technique de Chromatographie sur couche mince (CCM), et la comparaison des substances qui séparé avec (AG) et (Q).....	59
Figure 50. Dosage de polyphénol de l'extrait de (s) soxhlet et (m) macération	63
Figure 51. Dosage de flavonoïde de l'extrait de (s) soxhlet et (m) macération	63
Figure 52. Courbe d'étalonnage de l'Acide Gallique.....	64
Figure 53. Courbe d'étalonnage de la quercétine	65

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Diversité des espèces du genre <i>Helianthemum</i> , plantes-hôtes des terfez.	15
Tableau 2. Classification de la famille des polyphénols	19
Tableau 3. Les compositions du réactif de Melzer	21
Tableau 4. Principales caractéristiques des souches bactériennes testées.....	24
Tableau 5. Principales caractéristiques des souches fongiques testées.	25
Tableau 6. Systèmes solvants utilisés dans les séparations par (CCM)	34
Tableau 7. Composés phénoliques identifiés par (CCM)	35
Tableau 8. Les concentrations préparées de l'acide gallique	37
Tableau 9. Différents Concentration de la quercétine	38
Tableau 10. Rendement, aspect et la couleur des extraits de la méthanol et dichlorométhane d'ascomés desséchés de <i>Terfezia arenaria</i> , obtenus par macération et soxhlet	46
Tableau 11. Les diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques comme témoin positive.	56
Tableau 12. Résultats de la CCM de l'extrait de dichlorométhane par extraction par soxhlet.	60
Tableau 13. Résultats de la CCM de l'extrait méthanolique par extraction par macération...	61
Tableau 14. Teneurs en phénols totaux obtenus par les deux méthodes d'extraction	64
Tableau 15. Teneurs en flavonoïdes obtenus par les deux extraits	66

TABLE DES MATIERES

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

INTRODUCTION GENERALE 1

Chapitre I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralité des truffes 3

1.2. Origine et historique des Truffes 3

1.3. Biologie de Truffe 4

1.3.1. Forme décroissance de la truffier (Anatomie structurale) 4

1.3.1.1. Partie végétative 4

1.3.1.2. L'ascocarpe "Forme sexuée" 4

1.4. Répartition géographique 5

1.4.1. Répartition géographique de *Terfezia arenaria* dans le monde 5

1.4.1.1. Répartition géographique de *Terfezia arenaria* dans l'algérie 5

1.5. Position taxonomique 5

1.6. Cycle de vie des terfez 7

1.6.1. Dispersion des spores 7

1.6.1.1. Germination des ascospores 8

1.6.2. Morphogenèse des ascocarpes 9

1.6.3. Naissance du primordium 9

1.6.4. L'évolution de l'ascocarpe 11

1.7. Caractéristiques morphologiques des ascocarpes, asques et ascospores de *Terfezia arenaria* 13

1.8. Ecologie des truffes 14

1.8.1. Composition physico-chimique du sol 14

1.8.2. Paramètres climatiques des truffes 14

1.9. Plantes symbiotiques des Terfez 15

1.10. Substances naturelles viennent du métabolisme secondaire 16

1.10.1. Métabolites primaires 16

1.10.2. Métabolites secondaires	16
1.10.2.1. Polyphénols.....	16
1.10.2.1.1. Flavonoïdes	17
1.11. Valeurs nutritionnelles et thérapeutiques des truffes du désert	20
1.11.1. Composition chimique	20
1.11.2 Activités biologiques	20
Chapitre II: MATERIEL ET METHODES	
1. Matériel végétal	21
1.1. Identification botanique.....	21
1.1.1. Identification de genre	21
1.1.2. Identification de l'espèce	23
1.1.2.1. Description morphologique et anatomique des Terfez	23
2. Etude du pouvoir antimicrobien des ascomes desséchés et mûres de <i>Terfezia arenaria</i>	23
2.1. Matériel	23
2.1.1. Les ascomes de terfez.....	23
2.1.2. Souches bactériennes testées.....	24
2.1.3. Souches fongiques testées (champignons filamenteux et levures)	24
2.1.4. Milieux de culture	25
2.1.4.1. Milieux de culture des souches bactériennes	25
2.1.4.2. Milieux de culture des souches fongiques	25
2.2. Méthodes.....	26
2.2.1. Préparation des pré-cultures.....	26
2.2.1.1. Pré-cultures bactériennes	26
2.2.1.2. Pré-cultures fongiques	26
2.2.2. Conservation des souches testées.....	26
2.2.2.1. Souches bactériennes	26

2.2.2.2. Souches fongiques.....	26
2.3. Procédé d'extraction des substances bioactives à partir d'ascomes desséchés et mûres de <i>Terfezia arenaria</i>	26
2.3.1. Préparation des échantillons	26
2.3.2. Extraction des substances bioactives	27
2.3.2.1. Extraction par macération dans le méthanol	27
2.3.2.2. Extraction au soxhlet.....	28
2.3.2.2.1. Description et principe du Soxhlet.....	28
2.3.2.2.2. Mode opératoire	29
2.4. Méthode de préparation des extraits.....	30
2.4.1. Pour l'extrait de macération.....	30
2.4.2. Pour l'extrait de soxhlet.....	30
2.5. Tests de l'activité antimicrobienne de l'extrait brut des ascomes desséchés et mûres de <i>Terfezia arenaria</i>	31
2.5.1. Tests antibactériens	31
2.5.1.1. Préparation de l'inoculum	31
2.5.1.2. Ensemencement sur boîtes de Pétri	31
2.5.2. Tests antifongiques	32
2.5.2.1. Tests sur les souches des champignons filamenteux	32
2.5.2.2. Préparation des suspensions sporales	32
2.5.2.3. Ensemencement sur boîtes de Pétri.....	32
2.5.3. Tests sur les levures	33
2.5.3.1. Préparation de l'inoculum	33
2.5.3.2. Ensemencement sur boîtes de Pétri.....	33
2.5.4. Méthode de mesure de la sensibilité des souches testées	33
2.6. Dosage des polyphénols et flavonoïdes	34
2.6.1. Dosage qualitatif	34
2.6.1.1. Chromatographie sur couche mince CCM des extraits.....	34

2.6.2. Dosage quantitatif	36
2.6.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	36
2.6.2.1.1. Réactifs et extraits utilisés.....	36
2.6.2.1.2. Mode opératoire	36
2.6.2.2. Dosage des Flavonoïdes totaux.....	37
2.6.2.2.1. Réactifs et extraits utilisés.....	38
2.6.2.2.2. Mode opératoire	38
2.7. Analyse statistique des résultats.....	39
Chapitre III: RESULTATS ET DISCUSSION	
1. Identification des espèces de Terfez	40
1.1. Description morphologique et anatomique de l'espèce achetée	40
1.1.1. Aspects généraux des Terfez achetée	40
1.1.2. Structure macroscopique.....	41
1.1.3. Structure microscopique.....	42
1.2. Etude macro et microscopique des espèces de Terfez achetée <i>Terfezia arenaria</i>	43
2. Résultats d'extraction des substances bioactives par macération et Soxhlet.....	45
2.1. Extraction par macération dans le méthanol	46
2.2. Extraction par soxhlet dans le dichlorométhane	47
3. Etude de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'ascomés desséchés de <i>Terfezia arenaria</i>	47
3.1. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique.....	47
3.1.1. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique	47
3.1.2. Résultats de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique	50
3.2. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait brut obtenu par la méthode de Soxhlet	52

3.2.1. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut obtenu par la méthode de Soxhlet	52
3.2.2. Résultats de l'activité antifongique de l'extrait brut obtenu par la méthode de Soxhlet	54
3.3. Résultats de l'activité des antibiotiques avec cinq souches bactériennes	56
4. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits	59
4.1. Analyses qualitatives des extraits	59
4.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)	59
4.2. Analyses quantitatives des extraits	64
4.2.1. Dosage des polyphénols totaux.....	64
4.2.2. Dosage des flavonoïdes	65
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	
ANNEXE	
الملخص	
RESUME	
ABSTRACT	

INTRODUCTION GENERALE

La truffe du désert, appelée régulièrement «Terfez», est un champignon symbiote avec les Hélianthèmes, demeure encore une empreinte mystérieuse, mais aussi le témoin d'une adaptation étonnante aux conditions du désert, assurant une association biologique très particulière.

Quelle que soit l'espèce de Terfez, elle reflète le champignon hypogé comestible, non seulement appréciée par la population locale, mais présente également une notoriété mondiale du fait qu'elle soit très recherchée et considérée comme étant une denrée alimentaire de luxe (**Bradai, 2006**).

Les travaux de recherche sur Terfez dans le sud algérien sont peu nombreux, on trouve des études écologiques et mycorhization des diverses espèces de Terfez avec des plantes ; on cite **Fortas. (1990); Sadat. (1994); Tadj. (1996); Bassah. (1999); Bradai. (2006)**. une recherche du pouvoir antibactérien et antifongique de certaines espèces de Terfez (*Tirmania pinoyi*) (**Amara et Amire, 2007; Dib et al., 2013; Neggaz et al., 2016**).

De nombreux champignons supérieurs ont un intérêt en nutrition et en santé humaine. Plus de 2000 espèces sont comestibles, et près de 700 espèces possédant des propriétés pharmaceutiques intéressantes (**Wasser, 2002 et 2010**).

Les vertus médicinales des champignons supérieurs sont connues depuis des millénaires, notamment par la médecine asiatique. Quant à la mycothérapie, ce traitement par les champignons a émergé dans les années 70, 80 et depuis, des centaines de travaux réalisés par les chercheurs asiatiques ont confirmé son intérêt. Actuellement, la mycothérapie est reconnue dans le monde entier puisqu'on étudie les propriétés médicinales étonnantes des champignons en particulier, dans le traitement des maladies dégénératives et du cancer mais aussi pour d'autres pathologies. Les recherches sont surtout orientées sur leur activité antioxydant en raison de son rôle dans la prévention des maladies chroniques telles que les pathologies cardio-vasculaires, le cancer, le diabète, l'hypertension artérielle, et les maladies d'Alzheimer et de Parkinson en combattant le stress oxydatif (**Riboli et Norat, 2003; Cole et al., 2005**).

Dans notre présente étude, nous sommes intéressés l'identification des espèces du truffes de désert, et l'étude de l'activité antimicrobienne d'une espèce de terfez qui on le identifié : *Terfezia arenaria* provenant de la région frontalière entre la Lybie et la Tunisie, ces derniers travaux sont aussi suivis par des dosages des composés phénoliques et des

flavonoïdes, ainsi nous avons essayé de séparer les différents composés des extraits bruts obtenus par la méthode de macération et de Soxhlet.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1. Généralité des truffes

La truffe est un champignon Ascomycète hypogé, à aspect arrondi mais peut être irrégulier selon la nature du terrain (**Riousset et al., 2001**).

Le cycle biologique de la truffe est particulier; comme tout champignon, la truffe n'as pas de fonction chlorophyllienne, elle vit en symbiose avec une espèce végétale. C'est donc grâce à son système végétatif, le mycélium, que la truffe va chercher un plant hôte nourricière (**Riousset et al., 2001; Pargney, 2004**). La rencontre des radicelles de la plante hôte et du mycélium donne naissance à un organe mixte: la Mycorhize. Cette symbiose mycorhizienne permet à la truffe d'obtenir de la plante les substances organiques indispensables à son développement (**Fortin et al., 2008**).

On distingue deux catégories de truffe :

- Les truffes du genre *Tuber*.
- Les truffes du désert qui regroupent les genres *Terfezia*, *Tirmania* et *Picoa* (**Fortas, 1990; Fortas et Chevalier, 1992; zitouni-Haouar et al., 2015**).

1.2. Origine et historique des Truffes

Les truffes du désert ont été long temps confondues avec les truffes du genre *Tuber* (**Chatin, 1891**).

Le mot arabe "Terfez" et le mot français "Truffe" ont une même origine. Ils proviennent tous deux de "Tabarli"; nom apparu aux alentours de 3500 année A. JC dans le langage sumérien qui signifiait "champignon souterrain" (**Malençon, 1973; Trappe, 1979**).

Le terme Terfez, désigné sous le terme général de "truffe du sable" ou "truffe du désert", pour les différencier des autres truffes du genre *Tuber*, mais leur appellation diffère d'un pays à autre. Selon les régions dans lesquelles on les trouvait, les Terfez étaient désignés par des appellations diverses. En Europe, ils sont communément appelés "Truffes du désert" ou "Truffes du sable", en Algérie, ils sont appelés "Terfez, Terfas" et "Koma" en Kabylie (**Chatin, 1891**). On leur donne le nom de Kameh et kamés en Asie et Komah au Poche et Moyen-Orient (**Awameh et al., 1979**).

1.3. Biologie de Terfez

1.3.1. Forme de croissance de la truffier (Anatomie structurale)

1.3.1.1. Partie végétative

La partie végétative est très discrète et non comestible qui s'associe avec les racines de certains arbres. Cette partie est constituée de mycélium. De mycorhizes et de stromas; ces différentes formes sont reliées de façon complexe entre elles et avec le système racinaire (Ricard, 2003).

➤ Mycélium

Désigne l'ensemble des filaments, appelés hyphes, constituant un même organisme les filaments mycéliens s'organisent pour constituer des structures plus complexes élaborées par la truffe; Mycorhize; Stroma et Ascocarpe (Ricard, 2003).

➤ Stroma

Les filaments mycéliens peuvent s'agglomérer en pelotes denses qualifiées de stroma ces stroma sont des "faux tissus", formés par la soudure des filaments. Les stromas sont constitués d'hyphes agrégées en contact direct avec les cellules de l'écorce de la racine et se retrouvent dans le sol.

➤ Mycorhizes

La Mycorhize est un organe mixte formé par l'association entre une racine et un champignon du sol, elles favorisent l'absorption par les racines des éléments minéraux de la Rhizosphère et du sol et améliorent ainsi la nutrition de la plupart des espèces végétales (Ricard, 2003).

1.3.1.2. L'ascocarpe "Forme sexuée"

L'ascocarpe est constitué de filaments mycéliens organisés et spécialisés. La partie externe est appelée **Péridium**, partie centrale ou **Gléba** est à l'origine des ascus et des spores.

➤ Péridium

Péridium une structure résistante qui assure la protection de Gléba interne; peut présenter des écailles de dimension et de forme très différentes.

Au niveau des écailles du Péridium; il se forme des houppes de filaments mycéliens qui jouent un rôle actif dans les échanges nutritionnels entre le champignon et le sol.

On peut observer également en surface du Péridium, la formation de plaque calcaire d'une centaine de μm , provenant de précipitations de carbonates de calcium dues à des sécrétions acides par les filaments mycéliens.

Ces phénomènes protègent progressivement l'ascocarpe de la dessiccation et lui donnent une excellente résistance à la sécheresse (**Ricard, 2003**).

➤ **Gléba**

C'est la partie centrale; qu'est l'origine des asques et les spores; elle constitue la masse interne de l'ascocarpe dont coupe révèle; à maturité la présence "de marbrures" ou lignes sinueuses blanches appelées "veines". Ces veines est variable selon les espèces, ont reçu également le nom de "veines aérifères" ou "veines stériles" car elles ne contiennent jamais de spores ces veines remplies d'hyphes qui s'allongent, se ramifient et s'apparient entre elles pour former un véritable réseau mycélien; c'est l'hyphes est facilement visibles à la surface de truffes matures; ces veines s'ouvrent à l'extérieur au niveau des écaillés du Péridium de la truffe. Ou elles permettent les échanges gazeux entre la gleba du champignon et le sol (oxygène, gaz carbonique, vapeur d'eau) (**Ricard, 2003**).

La structure anatomique de Terfez n'est plus différente de celle de genre *Tuber* (**Fahrettin et Basaran, 1997; Bradai, 2006**).

1.4. Répartition géographique

Les deux genres de Terfez reconnus sont répartis essentiellement sur le pourtour du Bassin méditerranéen et dans zones arides sèches du Moyen Orient: en Afrique du Nord, dans le sud de l'Europe, approximativement entre le 28^{ème} et le 45^{ème} degré de latitude Nord (**Sadat, 1994**).

1.4.1. Répartition géographique de *Terfezia arenaria* dans le monde.

On rencontre *T. arenaria* en Espagne, en Italie (Sardaigne) et au Portugal (**Diez et al., 2002**); il est prédominant en Angleterre (**Mohamed-Benkada, 1999**).

Roth-Bejerano et al., (1990). signale la présence de *T. arenaria* en Palestine occupée, et il semble être la seule espèce connue en Chine (**Fortas, 1990**), *T. arenaria* se rencontre au Maroc et en Libye (**Khabar et al., 1994; in Khabar, 2002**). Et en Egypte (**Pacioni et El-Kholy, 1994**).

1.4.1.1. Répartition géographique de *Terfezia arenaria* dans l'Algérie.

Il se développe dans les zones semi-arides de l'Algérie telles que Saïda et Djelfa, (**Fortas, 1990**).

1.5. Position taxonomique

Les clés de la classification des Terfez selon plusieurs auteurs est basée essentiellement sur les caractéristiques du Péridium (aspect: couleur) et sur celles des spores

(forme; ornementation), des caractères complémentaires (forme outille des corps fructifères, coloration de la gléba ; disposition des veines, odeur) (**Chevalier et al., 1986**).

Selon la classification de (**Trappe, 1979**). Les Terfez appartiennent à :

- Règne : Fungi.
- L'embranchement : Septomycota.
- Le sous embranchement : Ascomycotina.
- La classe : Euascomycetes (Eutuniquées).
- La sous classe : Discomycetidae.
- L'ordre : Tubérales.
- La famille : Terfeziacea.
- Le genre : *Terfezia* ou *Tirmania*.

L'ordre auquel sont rattachées ces espèces fait toujours l'objet de recherche ; certains auteurs les rattachent à l'ordre des Tubérales, d'autre Pezizales. L'identification de genre est basée sur la propriété des asques par la méthode Chloro-ido-iodure ou réactive de Melzer ; le principe de cette méthode est basé sur la coloration des parois amyloïdes suite au taux et la présence d'amidon dans les parois.

La truffe du désert comprend une quatorze (14) espèces, réparties sur deux espèces principales *Terfezia* et *Tirmania* ; Selon **Trappe. (1979)**, le genre *Terfezia* regroupe douze (12) espèces et celui de *Tirmania* est représenté par deux (02) espèces.

➤ **Le genre *Terfezia***

-*Terfezia claveryi* (Chatin).

-*Terfezia spinosa* (Hark).

-*Terfezia longii* (Gilkey).

-*Terfezia arenaria* (Moris).

-*Terfezia leptoderma* (Tul).

-*Terfezia gigantea* (Imai).

-*Terfezia decaryi* (Heim).

-*Terfezia boudieri* (Chatin).

-*Terfezia pflleilii* (Henn).

-*Terfezia austroafricana* (Marasas et Trappe).

-*Terfezia arenaria* (Moris) (la seule espèce connue en chine).

-*Terfezia erimita* (Malençon).

➤ **Le genre *Tirmania***

-*Tirmania nivea* (Desf) Trappe.

-*Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon.

1.6. Cycle de vie des terfez

1.6.1. Dispersion des spores

Les truffes ont développé des stratégies de dispersion de leurs ascospores afin d'assurer leur progéniture. En effet, à maturité, les ascocarpes de ces mycètes hypogés émettent des odeurs typiques : des signaux chimiques, attirant plusieurs animaux mycophages tels que les porcs, les sangliers, les écureuils, les chevreuils, les élans, les chèvres de montagne, les ours sauvages, les rongeurs, les suricates, les marsipiaux, les hyènes brunes, les babouins et les oiseaux. Presque tous les mammifères sont attirés par ces champignons (**Percudani et al., 1999; Diez et al., 2002; Laessoe et Hansen, 2007**). Les ascospores de *Picoa lefebvrei* (= *Phaeangium lefebvrei*) seraient dispersées par de nombreuses espèces d'alouettes, de coursiers et de Huppés (**Laessoe et Hansen, 2007**). Tous ces animaux se nourrissent de corps fructifères et disséminent les spores lors de la défécation (**Ammarellou et al., 2007; Ammarellou et Saremi, 2007**). L'analyse de l'estomac de certains petits mammifères (campagnols et tamias) a révélé la présence de plus de 70% d'ascospores de truffes (**Laessoe et Hansen, 2007**). Cependant, d'autres auteurs suggèrent un autre mode de dissémination des spores de terfez. A maturité, les ascocarpes gonflent et craquèlent le sol ; les particules de sable transportées par le vent et les tempêtes de sable, laissent apparaître les ascocarpes, Ces derniers une fois exposés à la chaleur accablante du soleil du désert et à la sécheresse, se fendillent et exposent les spores. L'effet de l'abrasion des particules de sable libère les ascospores et le vent se charge de les emporter plus loin pour infecter d'autres sites (**Diez et al., 2002**). Ce mode de dispersion a été aussi décrit par des chercheurs koweïtiens (**Awameh et Alsheikh, 1979; 1980a et b**), qui ont démontré que les spores des terfez séchées et conservées pendant 9 mois, germent plus rapidement que celles provenant de corps fructifères frais.

La présence d'ascospores de truffes adhérentes à la surface des liodés adultes parasitant les ascocarpes de ces champignons montre que ces insectes participent aussi à la dissémination des spores de truffes (**Bratek et al., 1992**).

1.6.1.1. Germination des ascospores

Le cycle de vie des terfez n'est pas bien connu, certaines étapes du cycle sont hypothétiques (**Figure 01**). Les ascospores libérées germent après l'altération de leurs parois épaisses et donne naissance à un hyphes, puis au mycélium homocaryotique primaire.

Ce dernier aurait deux destinées :

- l'une représenterait la voie végétative, dans laquelle le mycélium homocaryotique croît dans le sol au voisinage des racines des plantes herbacées ou arbustives de la famille des Cistacées avec lesquelles il établit une association mycorhizienne.

Les mycorhizes formés vont émettre à leur tour des mycéliums qui fusionnent par plasmogamie au cours de la formation des primordiums (**Figure 02 B**).

- l'autre correspondrait à la voie sexuée, des filaments reproducteurs issus de spores de polarités différentes fusionnent par plasmogamie et donnent naissance à un mycélium secondaire hétérocaryotique qui infecte les racines des plantes hôtes et induit la formation des mycorhizes puis celle des primordiums (**Figure 02 A et C**). Ces derniers grossiront et formeront les terfez mûres.

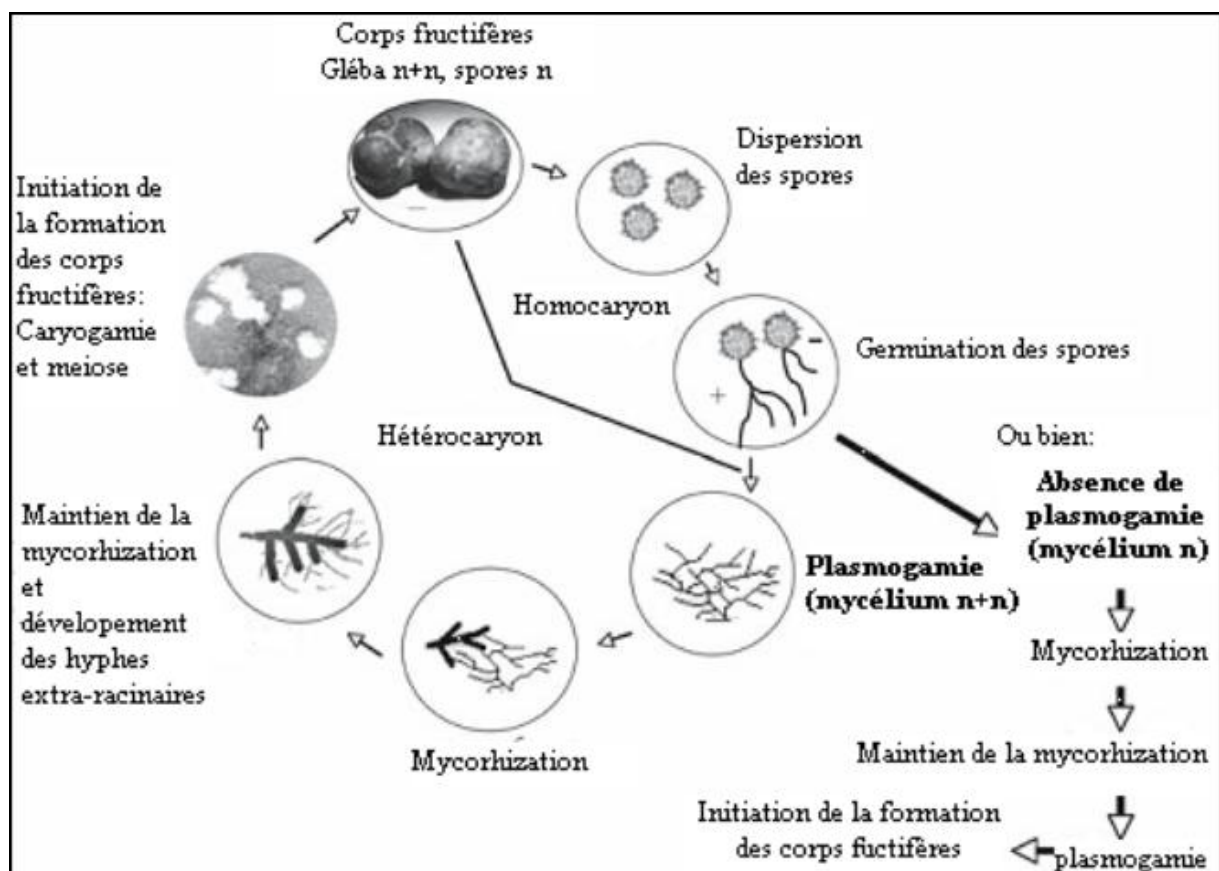


Figure 01. Cycle biologique des truffes du désert (Kagan-Zur *et al.*, 2008).

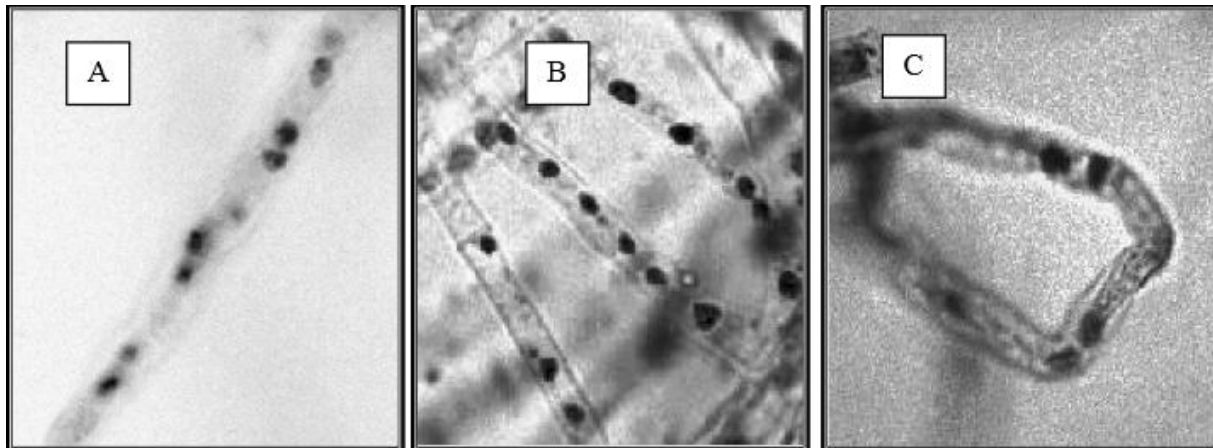


Figure 02. (A) Hyphe hétérocaryotique (à noyaux appareillés) originaire de la germination de veines stériles de la glèbe de *Terfezia pfeilii* ; (B) Hyphes homocaryotique originaires de la germination d'une seule spore de *Terfezia pfeilii* ; (C) Hyphe hétérocaryotique originaire de la germination des veines stériles de la glèbe de *Terfezia boudieri*; GX1000 (**Roth-Bejerano et al., 2004a**).

1.6.2. Morphogenèse des ascocarpes

La formation des corps fructifères est probablement l'étape la plus complexe dans le cycle de vie des champignons ; elle implique des changements spectaculaires dans le mode de développement de l'ascocarpe et à partir d'une maille lâche d'hyphes indifférenciés naît une structure compacte qui représente les ascomes.

1.6.3. Naissance du primordium

De nombreux travaux sont en désaccord sur l'origine (monosporique ou multispore) du mycélium infectant les racines des plantes hôtes. (**Fortas, 1990**) n'ont détecté aucune différence entre la capacité de l'infection des cultures monosporiques (issues d'une seule spore) et celles multispore (issues de plusieurs spores) de *T. arenaria*. Cependant, **Bonfante-Fasolo et Brunel. (1972)** ont montré que le mycélium monosporique de *Tuber melanosporum* n'était pas capable d'inoculer les plantes hôtes, indiquant que seule le mycélium hétérocaryotique résultant de plasmogamie était apte à former des mycorhizes.

Des travaux plus récents de (**Paolocci et al., 2006**), sur le polymorphisme des microsatellites de l'ADN de *Tuber magnatum* ont révélé que le mycélium végétatif infectant les racines est homocaryotique. Ces chercheurs ajoutent que la recombinaison des chromosomes ainsi que l'autofécondation ont lieu dans les primordiums.

Ces résultats rejoignent ceux de (**Bertault et al. 1998**) qui ont confirmé l'absence d'hétérozygotie chez de *Tuber melanosporum* puisque cette espèce possède un système d'accouplement très ferme, comme l'homothallisme ou l'autofécondation exclusive.

Par ailleurs, (**Roth-Bejerano et al., 2004a**) ont mis en évidence l'existence de carpophores hétérozygotes de Kalahari *tuber pfeilii* (*T. pfeilii*) hébergeant deux formes d'ITS. Chaque spore issue de ces ascocarpes héberge une des deux formes. De plus, ces auteurs ont montré que les hyphes stériles de la glèbe des corps fructifères de *T. pfeilii* et *T. boudieri* étaient hétéro caryotiques, leurs cellules sont multi nucléés à noyaux appareillés, alors que les hyphes issus de la germination d'une seule spore sont homocaryotiques.

La co-culture des mycéliums de deux ascospores différentes a apparemment facilité la plasmogamie, ayant pour résultat des mycéliums à noyaux appareillés, indiquant l'existence possible d'un hétérocaryon à long terme.

Des résultats similaires ont été trouvés par (**Aviram et al., 2004**) chez *T. boudieri* où les deux formes d'ITS cohabitant le même ascocarpe a été détectées dans l'hyphe isolé de cette espèce. Ces deux variantes ITS existent dans deux noyaux séparés qui partagent le même cytoplasme. La culture du mycélium hébergeant ces deux formes ITS différentes a été maintenue et testée pendant 10 ans, sans aucun changement des deux variantes. Par conséquent, un hétérocaryon existe à long terme (**Kagan-Zur et al., 2008**). Ont été les seuls à pouvoir élucider les premières étapes de la formation des corps fructifères des terfez, en obtenant en conditions axéniques et à partir de cultures polyspores, des primordiums (Fig.3 A). Le début de leur formation est indiqué par la présence de nombreux filaments mycéliens qui ressortent des racines mycorhizées. Ces filaments s'organisent en suite en une forme globuleuse régulière qui demeure en relation avec les racines puis grossit et se complique en présentant des masses pigmentées (**Figure 03 B**). L'étude des stades initiaux de la formation des ascocarpes de truffes du genre *Tubera* été suivie in situ, dans les terres de truffières, car les cultures in vitro de mycélium truffier n'ont pas abouti à la formation de primordiums. Chez *Tuber melanosporum*, le jeune primordium (**Figure 04**).

Comprend trois parties : une partie basale, constituant le pied produit plusieurs filaments recouvrant une partie médiane ascogoniale et une partie terminale (=le trichogyne) enroulée autour d'un hyphe mycélienne (**Callot, 1999**).

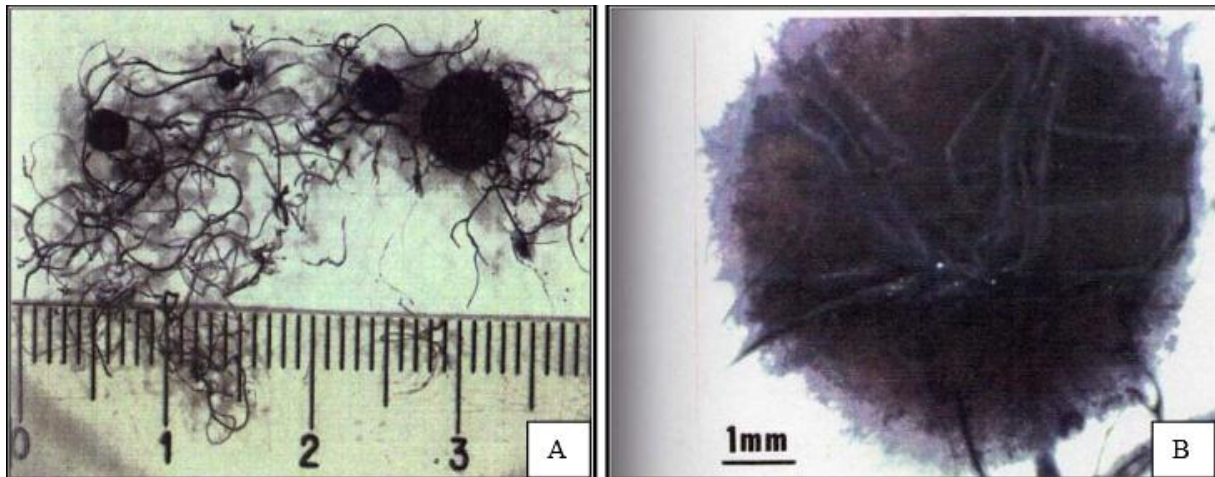


Figure 03. (A) Différents stades de développement de quatre primordiums de *Terfezia arenaria* en relation avec les racines d'*Helianthemum guttatum* (GX2) ; (B) Morphologie du primodium le plus développé en relation avec les racines mycorhizées d'*H.guttatum* (Gx10) (Fortas, 1990 ; Fortas et Chevalier, 1992 b).

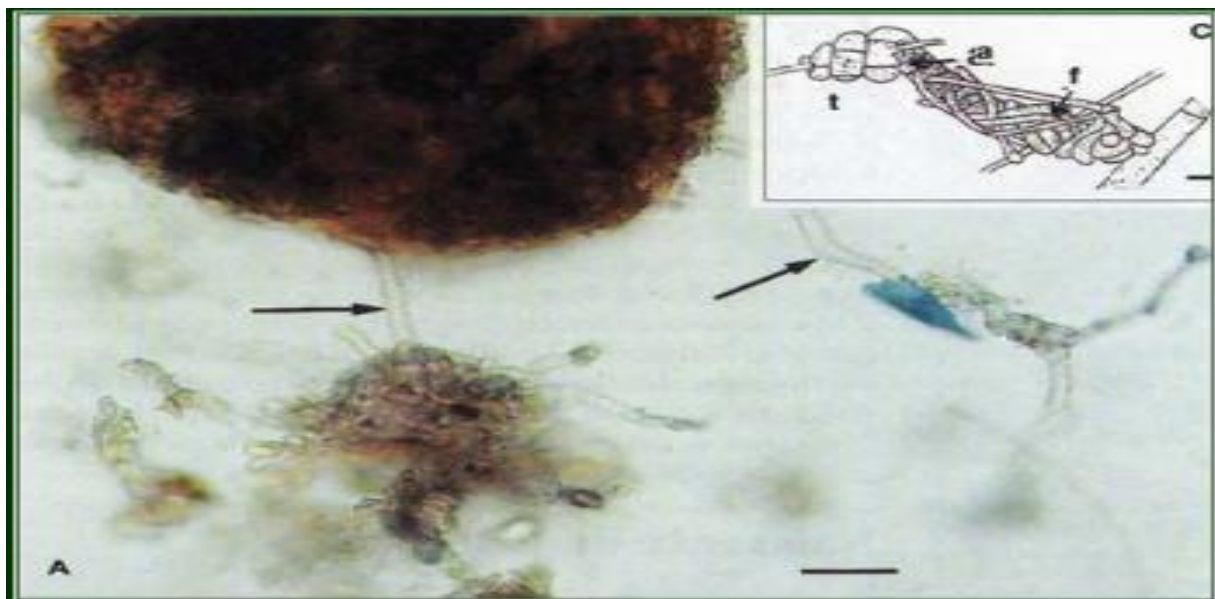


Figure 04. Primodium de *Tuber melanosporum*, les flèches indiquent les filaments mycéliens reliant primodium et ébauche ; (a) : ascogone ; (f) : filaments recouvrants ; (t) : trichogyne ; Echelle : 10 μm (Callot, 1999).

1.6.4. L'évolution de l'ascocarpe

Les hyphes formant les primordiums continuent à s'enrouler et à se compacter formant ainsi des jeunes ascocarpes globuleux immatures et protégés par un Périidium. La maturation des corps fructifères commence alors. Chez les terfez, le Périidium et la glèbe contiennent de nombreuses grandes cellules gonflées à parois minces. Ces cellules absorbent rapidement et

en grandes quantités l'eau, gonflent au cours du processus de maturation et assurent l'humidité nécessaire à la formation des spores (**Trappe et al., 2008b**). Plusieurs facteurs environnants, physiologiques et nutritionnels joueraient un rôle crucial dans le développement des corps fructifères. Des concentrations élevées d'ammonium inhibent la méiose et la morphogénèse des ascocarpes (**Murat et al., 2008b**). L'expression de la glutamine synthétase, enzyme responsable de l'assimilation du NH_4^+ dans le mycélium de *Tuber borchii* est élevée à une certaine étape du cycle de vie de cette espèce. Ceci pourrait signifier que les ascocarpes éprouvent la privatisation du NH_4^+ à une étape de leur développement qui demande une activité biosynthétique élevée (**Montanini et al., 2003**). Une dégradation des polysaccharides de stockage est également observée au cours du développement de l'ascocarpe pour fournir ainsi l'énergie métabolique nécessaire à ce processus (**Kues et Liu, 2000**). Par contre, durant la maturation des corps fructifères de *T. borchii*, la glycolyse est réprimée et le catabolisme des lipides, accumulés dans le mycélium végétatif, permet de maintenir le flux constant de carbone requis pour la maturation des ascomes (**Harki et al., 2006**). A constaté que la maturation de *T. melanosporum* est caractérisée par une augmentation significative du taux des hydrates de carbone et de la mélanine, ainsi que l'apparition du rahmnose, du calcium et du fer aux derniers stades de maturations. A maturité, les ascocarpes des terfez contiennent une concentration importante d'urée. Cette accumulation d'urée provoque une augmentation de la pression osmotique cellulaire dans les ascocarpes, ce qui cause leur turgescence et par conséquent l'augmentation de la taille des corps fructifères. Comme les tissus du Péridium ne se dilatent pas, celui-ci se rompt (**Mohamed-Benkada, 1999**) et libère les ascospores (**Ewaze et Al-Naama, 1989**). De nombreux auteurs ont constaté la présence d'un pédicule à la base des corps fructifères des terfez, de 2 à 15 cm de longueur composé d'agrégats d'hyphes lâches compacts incorporant des particules de terre et des racines (**Bouchareb, 1994**). Les ascomes commenceraient leur développement à partir de ces agrégats d'hyphes. (**Awameh et Alsheikh, 1979**), indiquent que cette structure est plus fragile lorsque les ascocarpes deviennent mûrs et leur récolte brutale rompt leur liaison. De ce fait, la plupart des ascocarpes des terfez n'en possèdent pas (**Kovacs et al., 2007**). Ces structures auraient sans aucun doute un rôle important dans la nutrition du tubercule.

Certains chercheurs ont signalé la présence de sclérotés attachés aux racines des plantes hôtes de *Mattiolomyces terfezioides* (= *Terfezia terfezioides*), ressemblant à celles des morilles (**Kovacs et al., 2007**). Ces structures joueraient un rôle important dans la conservation du mycélium des terfez pendant l'hiver. Pour assurer la croissance de leurs

ascocarpes, les champignons hypogés doivent interagir avec leur micro environnement afin d'y prélever les nutriments du sol. Chez les terfez, le cortex des ascocarpes est constitué d'hyphes peu différenciés par rapport à celles qui forment les couches les plus internes du Péridium et de la glèbe. Les hyphes les plus externes se dissocient de leurs voisines, créant ainsi des interstices entre elles. Elles forment à la surface du Péridium des émergences plus ou moins arquées qui explorent le microenvironnement. Dans les interstices, des particules de sol peuvent s'incruster entre les hyphes de surface. Parfois, de fortes concentrations en minéraux sont observées (**Pargney, 2004**). Chez les *Tuber* à péridium écailleux, les hyphes du péridium montrent une différenciation beaucoup plus poussée, les houppes mycéliennes. Ces dernières constituent un continuum entre le sol et l'intérieur de la truffe. Ces filaments mycéliens participent au transfert de l'eau et des éléments nutritifs vers l'ascocarpe (**Boumaza et al., 2001**).

1.7. Caractéristiques morphologiques des ascocarpes, asques et ascospores de *Terfezia arenaria*

Terfezia arenaria Selon **Trappe. (1971)**, on préfère un sol sablonneux, acide des régions semi-arides (**Diez et al., 2002, Khabar et al., 2001**), humifère de couleur grise, ne dépassant pas 25cm de profondeur (**Khabar, 2002**). L'ascocarpe de *T. arenaria* peut avoir une morphologie variable Selon **Khabar. (2002)**, l'espèce du Maroc apparaît dès le mois de mars. Ses ascocarpes mesurent 2 - 10 cm de diamètre et leurs poids sont de 4 - 200 g ; leur morphologie peut être : subglobuleuse, cordiforme (ou bosselée). L'ascocarpe est limité par un péridium lisse, mat, blanc crémeux, tournant avec l'âge au brun roux plus ou moins foncé, avec une épaisseur de 0.5-2.5mm. La glèbe est blanchâtre, elle devient marbrée en rose à maturité (**Diez et al., 2002**). Elle est lobée ou divisée en petites masses (**Chatin, 1892**), avec des poches jaunes à marrons sombres (**Trappe, 1971**). L'espèce marocaine a une glèbe de couleur rosâtre devenant à maturité ochracée olivacée à marron (**Khabar, 2002**). L'asque de *T. arenaria* une forme subglobuleuse à ellipsoïde (**Trappe, 1979**). Contenant 5 à 8 ascospores de 51-56 x 62-65 µm de diamètre (**Chatin, 1892**). Et peut aller jusqu'à 75-100 x 100-120 µm. Il est formé de deux types de cellules dont une représente l'appareil sporophytique producteur des asques et l'autre forme le tissu de soutien stérile. Les ascospores sont sphériques avec une taille de 20-26 µm de diamètre, elles sont entourées d'une paroi hyaline, épaisse et régulière, dont la partie externe est sombre et ornée avec présence des verrues cylindriques à extrémité tronquée de 4 - 7 µm d'hauteur. (**Fortas, 1990; Diez et al., 2002; Khabar, 2002**). (**Figure 05**).

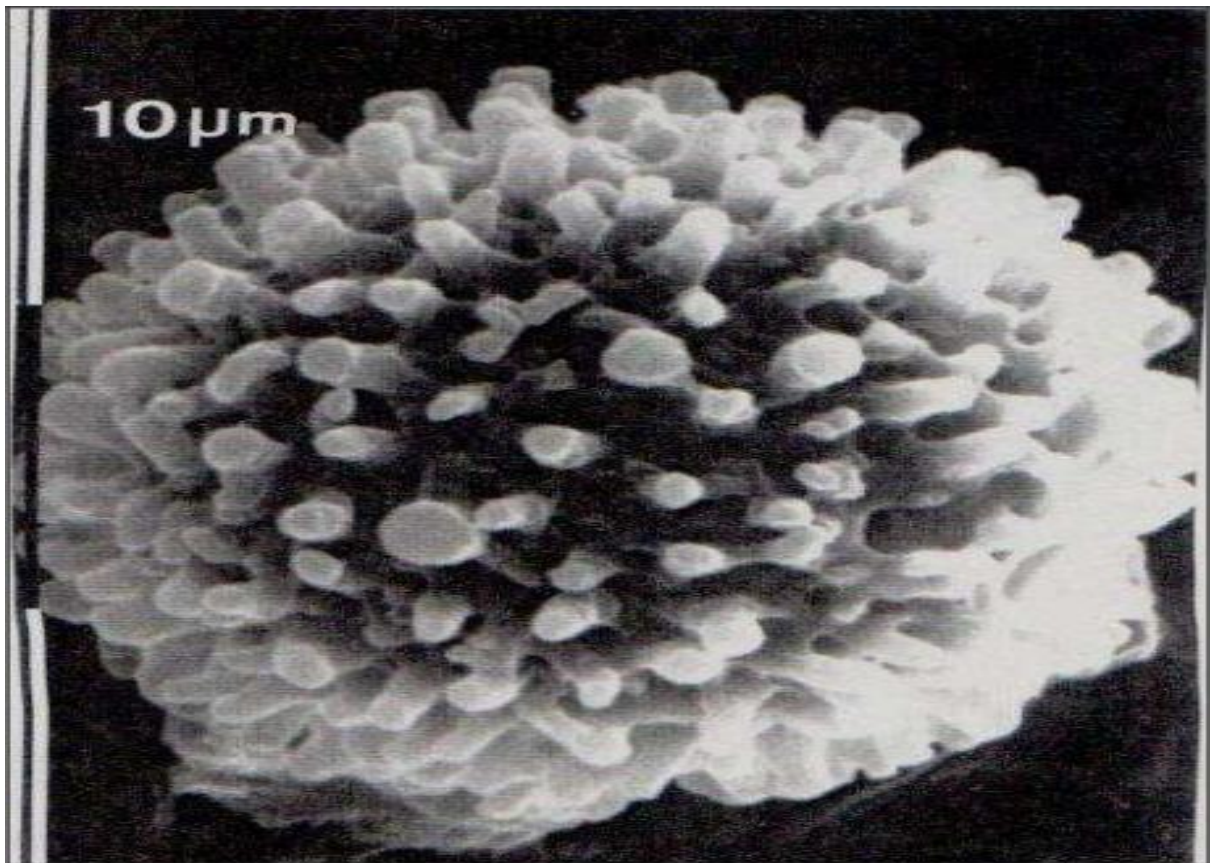


Figure 05. Ascospore de *T. arenaria* (Moris) Trappe de la station de Zeriguet (Wilaya de Saïda) montrant les verrues cylindriques tronquées au sommet, observée au microscope électronique à balayage Gx 3240 (Fortas, 1990).

1.8. Ecologie des truffes

1.8.1. Composition physico-chimique du sol

En Algérie, les truffes du (genres *Terfezia* et *Tirmania*) se développent dans les régions arides et semi arides, sur un sol sablonneux ou sablo-limoneux à dominance d'argile et du limon (genre *Picoa*), relativement pauvre en matière organique, riche en magnésium, bien pourvu en potassium, pauvre en phosphore, a pH alcalin (Fortas, 1990; Zitouni, 2010; Bradai *et al.*, 2013, Zitouni-Haouer *et al.*, 2014).

1.8.2. Paramètres climatiques des truffes

De façon générale, les régions où poussent les truffes du désert se caractérisent par une pluviométrie annuelle comprise entre 50 et 380 mm. Par ailleurs, un bon rendement en truffes dans les pays d'Afrique du Nord est obtenu lorsque la pluviométrie annuelle varie de 70 à 120 mm, alors que dans les pays d'Europe du Sud les bonnes productions en truffes coïncident avec des pluviométries variant entre 100 et 350 mm. En outre, la quantité et la périodicité de

ces précipitations sont importantes c'est-à-dire la pluie est nécessaire au plus tard au début Décembre en Afrique du Nord et au Moyen-Orient et au plus tard début Octobre dans les pays du sud de l'Europe (Morte *et al.*, 2009).

En Algérie, Les terfez se développent sous un climat chaud à condition qu'une bonne précipitation automnale et/ou hivernale, suivies d'une période de sécheresse. Ces pluies, même de faible quantité, jouent plusieurs rôles, notamment dans le transport, la dispersion et la germination des ascospores, mais également la germination et la croissance des plantes hôtes (*hélianthèmes*). Les pluies du printemps, favorisent la formation et la maturation des ascospores (Bradai *et al.*, 2013 et 2015).

1.9. Plantes symbiotiques des Terfez

Les truffes vivent en association mycorhizienne, avec des plantes annuelles ou pérennes. Elles s'associent avec des plantes annuelles de la famille des Cistacées et plus particulières avec des *Hélianthèmes* (Alsheikh et Trappe 1983; Moreno *et al.*, 2002; Diez *et al.*, 2002). Au Kuwait les truffes du désert vivent en symbiose avec *Helianthemum ledifolium* et *Helianthemum salicifolium* (Awameh *et al.*, 1979). En France, les Terfez associent aussi à d'autres plantes annuelles : *Artemisia herba alba*, *Plantago albicans* (Janex-Favre *et al.*, 1988). *Helianthemum almeriense* et avec *Helianthemum ovatum* (Kovacs *et al.*, 2002). Au Maroc, les Terfez sont trouvés en symbiose avec le genre *Helianthemum*, le genre *Cistus* et le genre *Pinus* (Khabar, 2001). En Algérie, les Terfez vivent en symbiose avec l'*Helianthemum guttatum* (Fortas, 1990).

Tableau 01. Diversité des espèces du genre *Helianthemum*, plantes-hôtes des terfez.

Pays	Plante-hôte	Références
Algérie	<i>Helianthemum guttatum</i> , <i>H. lippii</i> , <i>H. aegyptiacum</i> , <i>H. salicifolium</i>	Fortas. (1990); Fortas et Chevalier. (1992 b).
Koweït	<i>H. ledifolium</i> , <i>H. salicifolium</i>	Awameh et Alsheikh. (1979 b); Alsheikh et Trappe. (1983).
Maroc	<i>H. apertum</i> , <i>H. guttatum</i> , <i>H. hirtum</i> , <i>H. lippii</i> , <i>H. Macrosepalum</i>	(Khabar <i>et al.</i> , 2001); Khabar. (2002); Khabar et Nadjim. (2004).
Tunisie	<i>H. salicifolium</i> , <i>H. lippii</i> var.	(Slama <i>et al.</i> , 2006).

1.10. Substances naturelles viennent du métabolisme secondaire

La plante est le siège d'une activité métabolique aboutissant à la synthèse des métabolites primaires et secondaires (**Hartmann, 2007**).

1.10.1. Métabolites primaires

Sont indispensables à l'existence de la plante, se trouvent dans toutes les cellules de l'organisme d'une plante pour y assurer sa survie, ils sont classés en quatre grandes familles, à savoir, les glucides, les lipides, les acides aminés (Protéines) et les acides nucléiques.

1.10.2. Métabolites secondaires

Sont des produits du métabolisme secondaire (Exclusivité du monde végétal), ayant une répartition limitée, sont d'une grande variété structurale. Les métabolites secondaires sont divisés principalement en trois grandes familles, les polyphénols, les terpènes et les alcaloïdes (**Abderrazak et Joël, 2007**).

1.10.2.1. Polyphénols

Ou « Composés phénoliques » regroupe un vaste ensemble de plus de 8000 molécules (**Garcia-Salas et al., 2010**). Les polyphénols sont synthétisés par deux voies biosynthétiques: celle du shikimate, et celle issue de l'acétate (**Bruneton, 2009**).

L'élément structural fondamental qui caractérise les polyphénols est la présence d'au moins un noyau benzénique auquel est directement lié au moins un groupement hydroxyle ainsi que des groupes fonctionnels (Ester, Méthyle ester, Glycoside...) (**Bruneton, 1999**).

Les polyphénols sont classés selon le nombre d'atomes de carbone dans le squelette de base (**Dacosta, 2003**). Il existe plusieurs classes des polyphénols, principalement, les acides phénoliques simples, les phénols simples, stilbènes, coumarines, tanins, quinones, flavonoïdes, lignanes, lignines et xanthones (**Tableau 02**).

- Acides phénoliques simples
 - Acides hydroxybenzoïques
 - Acides hydroxycinnamiques
- Quinones
- Tannins
- Coumarines
- Lignanes
- Stilbènes
- Anthocyanes

1.10.2.1. Flavonoïdes

Sont des composés dont la structure de base est C6-C3-C6 et sont constitués de deux noyaux aromatiques (Cycle **A** et **B**) reliés par un hétérocycle oxygéné (Cycle **C**), c'est le squelette de base des flavonoïdes (Erlund, 2004) (Tableau 03, Figure 06).

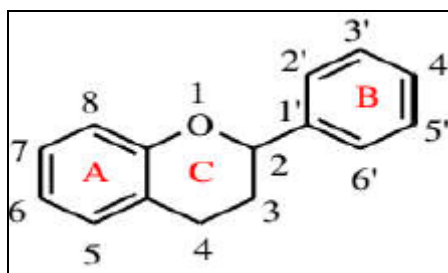


Figure 06. Squelette de base des flavonoïdes (Erlund, 2004).

On les retrouve dans toutes les plantes vasculaires, dans divers organes : racine, tiges, feuilles et fruits (Bruneton, 1999). Ils sont synthétisés au niveau du chloroplaste et participent à la phase lumineuse de la photosynthèse comme transporteurs d'électrons, certains quittent le chloroplaste et s'accumulent dans les vacuoles (Elicoh-Middleton, 2000).

Les flavonoïdes se rencontrent libre (Aglycones ou génines), soit sous forme d'hétérosides C- ou O-glycosides comme l'hyperoside et la rutine (Glycoside entre la quercétine de flavonol et le rutinose de disaccharide) (Dacosta, 2003). Ils se répartissent en plusieurs classes : flavones (Apigénine, Luteoline), flavonols (Quercétrine, Kaempférol, Myricétine et Catéchine), flavanones (Naringénine), dihydroflavonols, flavanes, flavanonols, flavan-3-ols (Epicatéchine), flavylum, chalcones, aurones et anthocyanines (Pélagonidine, cyanidine et péonidine), les chalcones (Butéine et phlorétine) et les isoflavonoïdes (Isoflavones, roténoïdes) et les coumaranochromones (Bruneton, 2009) (Figure 08).

Les flavonoïdes partagent une origine biosynthétique commune, suite à deux voies complémentaires, voie acétate malonate et voie shikimate (Elicoh-Middleton, 2000) (Figure 07).

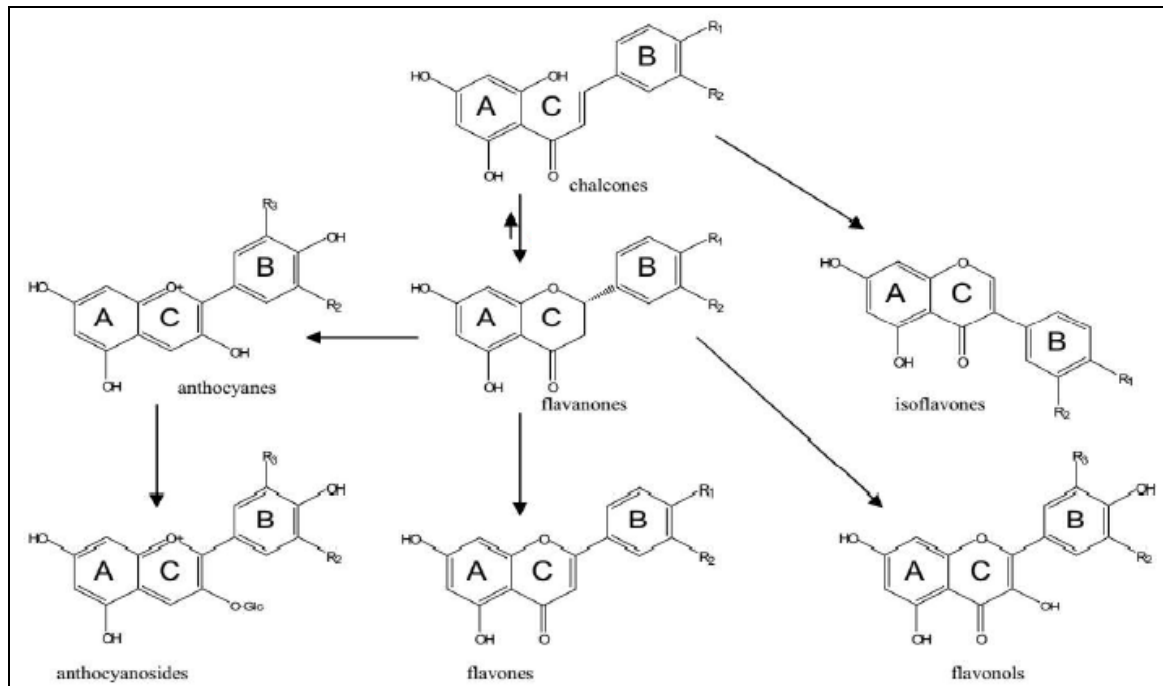
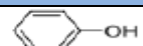

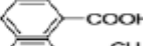



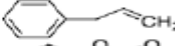
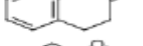





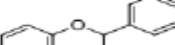



Figure 07. Schéma récapitulatif de la biosynthèse des différentes classes de flavonoïdes (Winkel-Shirley, 2001).

Tableau 02. Classification de la famille des polyphénols (Garcia-Salas *et al.*, 2010).

Numéro de Carbone	Classe	Structure de base
C6	Phénols simple	
C6	Benzoquinones	
C6-C1	Acide benzoïque	
C6-C2	Acétophénonnes	
C6-C3	Acide phénylacétique	
C6-C3	Acide cinnamique	
C6-C3	Phénylpropène	
C6-C3	Coumarines	
C6-C3	Chromones	
C6-C4	Napthoquinones	
C6-C1-C6	Xanthones	
C6-C2-C6	Stilbenes	
C6-C2-C6	Anthraquinones	
C6-C3-C6	flavonoïdes	
(C6-C3)2	Lignanes, neolignanes	
(C6-C1) n	Tannins hydrolysables	Polymère hétérogène composé d'acides phénoliques et sucres simples
(C6-C3) n	Lignines	Aromatique hautement réticulé Polymère

1.11. Valeurs nutritionnelles et thérapeutiques des truffes du désert

1.11.1. Composition chimique

Les terfez représentent une source nutritive non négligeable par leur richesse en protéines (8-27 %), acides gras (1,3-7,5%), fibres (2,6-13%), hydrates de carbone (16.66-60%) et en vitamines (2-5% d'acide ascorbique) (Hussain et Al-Ruqaie, 1999; Khabar, 2002; Khabar *et al.*, 2004; Shavit, 2008). Elles sont également riches en minéraux: potassium, magnésium, phosphore, sodium et calcium (Dundar *et al.*, 2012).

1.11.2. Activités biologiques

Outre leur valeur nutritive, les truffes du désert sont utilisées de puis long temps en médecine traditionnelle par les populations autochtones d'Afrique du Nord et du Moyen-Orient (Shavit et Shavit, 2014) en particulier les bédouins et les nomades du désert qui les emploient pour traiter les infections oculaires (Volpato *et al.*, 2013), les rhumes, les affections respiratoires, l'arthrite ou le rhumatisme (Volpato *et al.*, 2013). C'est ainsi que de nombreux chercheurs se sont intéressés aux activités biologiques de ces champignons. Différents travaux ont montré que les extraits de *Terfezia* et de *Tirmania* possèdent une activité antibactérienne sur diverses bactéries pathogènes Gram- et Gram+ et une activité antifongique surtout sur *Candida albicans* et *Aspergillus niger* (Mohamed-Benkada, 1999; Janakat *et al.*, 2004; 2005; Neggaz, 2010). Les extraits des truffes du désert n'ont aucun effet antibactérien sur certaines bactéries lactiques à effet probiotique (Saddiq *et al.*, 2015). Les truffes du désert contiennent des antioxydants, ces derniers protègent le corps humain des dommages du stress oxydatif induit par la formation des radicaux libres (Dahham *et al.*, 2016). D'autres travaux ont également montré que les extraits de truffes ont des propriétés hépato protectrices (Janakat et Nassar, 2010), anticancéreuses (Mekawey, 2015; Dahham *et al.*, 2016) et aphrodisiaques (Khojasteh *et al.*, 2013; AL-Damegh, 2014).

Les effets thérapeutiques des Terfez sont connus aussi chez les musulmans de puis Long temps de Notre Prophète Mohamed (صلى الله عليه وسلم) a égalé évoqué l'importance thérapeutiques :

في فتح الباري شرح البخاري لأحمد بن حجر العسقلاني نجد الحديث التالي حدثني محمد بن المثنى حدثنا غندر شعبة عبد الملك قال سمعت النبي صلى الله عليه وسلم يقول " الكما من المن وماؤها شفاء للعين ".
وروى الترمذي عن أبي هريرة رضي الله عنه أن أناس من أصحاب النبي صلى الله عليه وسلم قالوا الكمأة جدري الأرض , فقال النبي صلى الله عليه وسلم الكمأة من المن وماؤها شفاء للعين والعجوة من الجنة وهي شفاء من السم .
أخرج الترمذي في جامعه بسند صحيح أن أبي هريرة قال " أخذت ثلاثة أكمؤ أو خمسا أو سبعا فعصرتهن فجعلت ماءهن في قارورة فكحلت بها جارية لي فبرئت ".

CHAPITRE II : MATERIEL ET MÉTHODES

1. Matériel végétal

1.1 L'origine de la truffe

L'origine de l'espèce qui acheté est entre l'état de libye et tunisie.

1.2. Identification botanique

L'identification de genre des espèces récoltées est basée sur la propriété des asques par la coloration **Chloro -ido- iodure ou réactif de Melzer**.

L'identification des espèces de Terfez été basée sur les caractères morphologiques des corps fructifères et la couleur de gléba, ainsi que les nombres des spores; d'asque et leur morphologie.

L'identification des espèces se fait par la comparaison des observations Macroscopiques et microscopique des espèces acheté à l'aide les descriptions de classification selon **Trappe. (1979)**.

1.2.1. Identification de genre

- Coloration des asques

Préparation le réactif de Melzer

Nous avons pu préparer une solution du réactif de Melzer qui comporte la composition suivante, le protocole dans la **Figure 08**.

Tableau 03. Les compositions du réactif de Melzer (**Josserand, 1983**).

Matière	Quantité
Eau distillée	100 g
L'iodure de potassium	5 g
L'iode	1,5 g
Hydrate de chloral	100 g

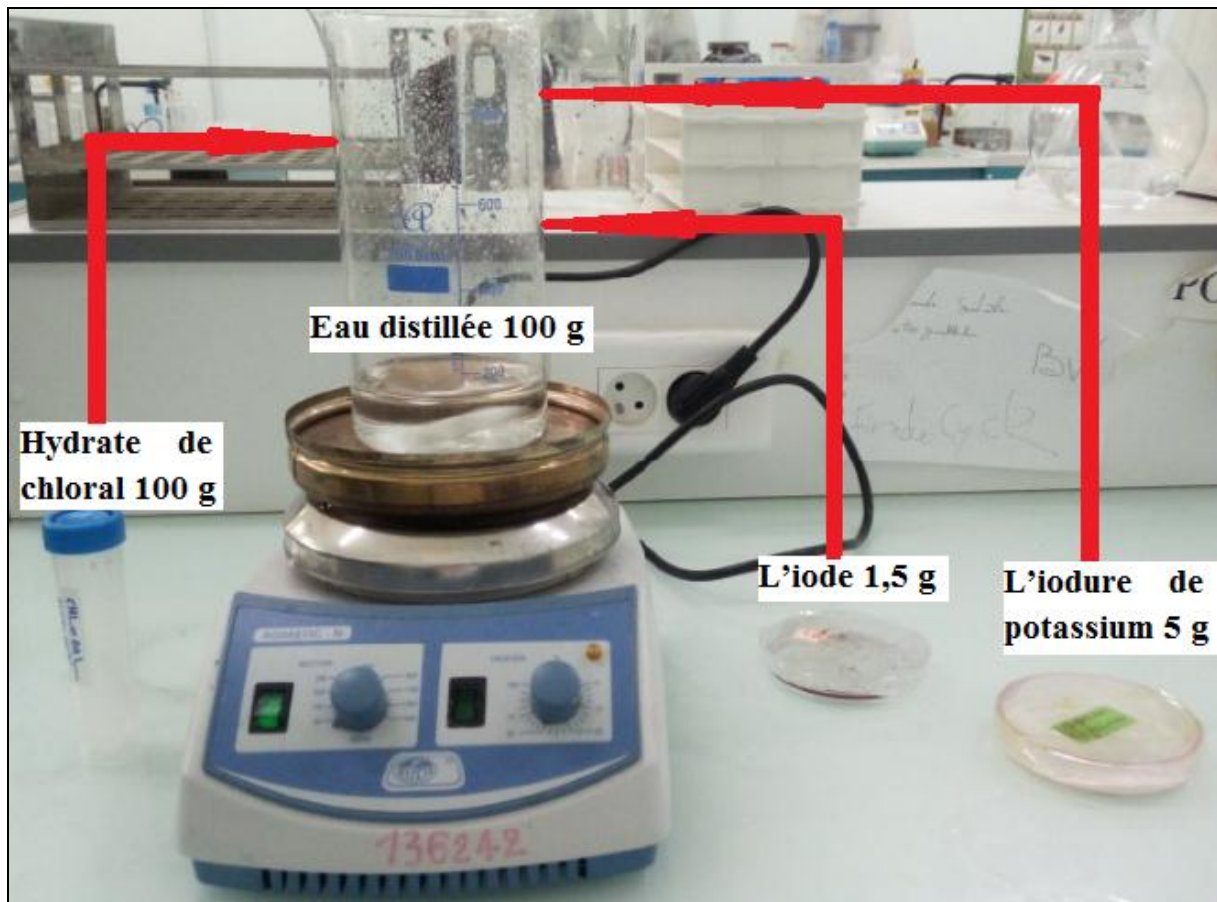


Figure 08. Préparation le réactif de Melzer (Josserand, 1983).

Le principe de cette méthode est basé sur la coloration des parois amyloïdes suite au taux et la présence d'amidon dans les parois. Les asques du genre *Terfezia* se colorent en jaune ou orange, et ceux du genre *Tirmania* prennent une teinte grise bleue (Trappe, 1979).

Pour la coloration des asques par le réactif de Melzer, nous avons pris un fragment du champignon récolté ; mur puis desséché et broyé. Ensuite, nous avons additionné quelques gouttes du réactif de Melzer, après 10 min nous avons effectué une observation au microscope optique à grossissement x40 et x100. Plusieurs observations successives s'imposent après des temps de 4, 6, 24, jusqu'à 48 heures, afin de confirmer la coloration finale des asques.

Avant de préparer ce réactif, il faut suivre les recommandations suivantes :

- ❖ Bien mélangé et attendre jusqu'à la dissolution totale de chaque constituant avant d'ajouter le suivant.
- ❖ Ne pas amener l'iode au contact d'objets métalliques, qu'il attaque très aisément. La dissolution de l'iode peut être assez lente.

- ❖ Le réactif de Melzer est assez dangereux : l'hydrate de chloral est toxique, éviter tout contact avec la peau ou les yeux, et éviter de respirer les vapeurs.
- ❖ Il faut éviter d'en tacher les vêtements en coton (l'iode se fixe sur la cellulose ; il donne une coloration noirâtre les taches peuvent être enlevées à l'aide d'une solution diluée de thiosulfate de sodium : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

1.2.2. Identification de l'espèce

Pour la détermination de l'espèce, nous sommes basés sur les descriptions de (**Trape, 1979; Awameh et Alsheikh, 1980; Fortas *et al.*, 1990; Bessah, 1999; Bouchet, 1999**).

1.2.2.1. Description morphologique et anatomique des Terfez

A- Les caractères macroscopiques

L'examen des caractères macroscopiques a été effectué pour chaque partie du champignon, à savoir l'ascocarpe, le Péridium, et le gléba, du point de vue forme, couleur, et la taille (**voir Annexe 01**).

B- Les caractères microscopiques

L'examen des caractères microscopique a été effectué par le prélèvement d'un fragment frais de l'espèce à l'aide d'une aiguille; le mettre sur une lame ; ajouter une goutte de l'eau distillée, ensuite la recouvrir par une lamelle, l'observation se fait sous microscopique optique avec des plusieurs grossissement déférentes, qui permettent d'observer la morphologie des asques, des ascospores et mesurer leur dimension ,la mesure ont été effectuées à l'aide d'un logiciel Bio microscopique Motic Image plus 2..0 qui permet de donner la dimension réelle des asques et ascospores.

2. Etude du pouvoir antimicrobien des ascomes desséchés et mûres de *Terfezia arenaria*

2.1. Matériel

2.1.1. Les ascomes de terfez

L'espèce de terfez utilisée pour l'étude du pouvoir antimicrobien est *Terfezia arenaria* (Chatin).

2.1.2. Souches bactériennes testées

Les souches bactériennes utilisées pour l'étude du pouvoir antibactérien des ascomes de *Terfezia arenaria* au nombre de 5. Trois d'entre elles sont à Gram- (*Escherichia coli*

ATCC 25922, *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 23853, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028) et l'autre sont à Gram+, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, et *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) (**tableau 04**).

Tableau 04. Principales caractéristiques des souches bactériennes testées.

Souches bactériennes	Caractéristiques microscopiques observées
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (Instituts Pasteur d'Oran)	Bacille à Gram négatif
<i>Pseudomonas aerogenosa</i> ATCC 23853 (Instituts Pasteur d'Oran)	Bacille à Gram négatif
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028 (Laboratoire de Biologie des micro-organismes et de Biotechnologie d'Oran)	Bacille à Gram négatif
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (Instituts Pasteur d'Oran et de Paris)	Coque à Gram positif
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 61299 (Instituts Pasteur d'Oran)	Coque à Gram positif

2.1.3. Souches fongiques testées (champignons filamenteux et levures)

Dans l'étude du pouvoir antifongique des ascomes de *Terfezia arenaria*, trois souches fongiques sont testées; deux d'entre elles sont des champignons filamenteux appartenant à la classe des Deutéromycètes (*Aspergillus Niger* et *Pinicillium*) et l'autre sont de champignon unicellulaire, de levure (*Candida albicans* ATCC 10231) (**tableau 05**).

Tableau 05. Principales caractéristiques des souches fongiques testées.

Souches fongiques	Caractéristiques macroscopiques et microscopiques observées	Phytopathologies et pathologies humaines signalées dans la littérature
<i>Aspergillus Niger</i> (laboratoire de microbiologie de m'sila)	Culture mycélienne jeune incolore devenant noire avec l'âge. Conidiophores renflés à leur extrémité en une vésicule qui porte des stérigmates qui portent aussi à leur tour une chaîne de conidies noires.	Détérioration des céréales, des fruits, des légumes, et du fourrage, etc. Il peut être responsable d'atteintes pulmonaires et sinusites aspergillaires (Samson et al., 2001).
<i>Candida albicans</i> ATCC10231 (Institut Pasteur d'Oran)	Colonies sur milieu en boîte de Pétri grandes, rondes et de couleur blanche ou crème. Levures rondes à ovoïdes.	Saprophyte commensal des muqueuses chez l'homme (bouche, tube digestif...) chez 80% de la population. Il peut provoquer des mycoses (candidoses) essentiellement au niveau des muqueuses digestives et gynécologiques (Laverdière, 2006).
<i>Pinicillium</i> (laboratoire de microbiologie de m'sila)	Les colonies, duveteuses ou poudreuses, à croissance rapide, sont généralement vertes ou plus rarement blanches.	Les <i>Pinicillium</i> sont des champignons polyphages, très commune dans l'environnement pouvant être responsables de nombreuses dégradations. Ils ont pour habitat de sol (anonyme 01).

2.1.4. Milieux de culture

2.1.4.1 Milieux de culture des souches bactériennes

La (GN) et le bouillon nutritif sont utilisés pour la culture des souches bactériennes testées (**annexe 02**). Le milieu (MH) est employé pour le test d'activité antibactérienne en boîtes de Pétri (**annexe 02**).

2.1.4.2. Milieux de culture des souches fongiques

Le milieu (PDA) est utilisé pour la culture des souches de champignons filamenteux et le milieu Sabouraud est utilisé pour la culture des levures. Leurs compositions sont indiquées en **annexes 02**.

2.2. Méthodes

2.2.1. Préparation des pré-cultures

2.2.1.1. Pré-cultures bactériennes

Afin de stimuler la croissance des souches bactériennes conservées, ces dernières sont ensemencées dans des tubes à essai contenant du bouillon nutritif puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Après croissance, les souches sont repiquées sur gélose nutritive en boîtes de Pétri puis incubées à 37°C pendant 24 heures.

2.2.1.2. Pré-cultures fongiques

Des implants mycéliens de 5mm environ de côté sont prélevés à partir des cultures mères des souches fongiques conservées; ils sont ensemencés sur milieu (PDA) en boîte de Pétri. Les boîtes sont incubées à 25°C pendant 4 jours. Les levures sont ensemencées par la méthode des stries d'épuisement sur milieu Sabouraud en boîtes de Pétri. Ces dernières sont incubées à 28° C pendant 2 à 3 jours.

2.2.2. Conservation des souches testées

2.2.2.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes sont conservées dans des tubes de gélose nutritive inclinée à une température de 10°C. Le repiquage a lieu tous les trois mois sur un nouveau milieu.

2.2.2.2. Souches fongiques

Les souches fongiques mycéliennes et levuriformes sont conservées respectivement dans des tubes contenant les milieux (PDA) ou Sabouraud inclinés, à une température de 10°C. Le repiquage a lieu tous les trois mois sur un nouveau milieu.

2.3. Procédé d'extraction des substances bioactives à partir d'ascomés desséchés et mûres de *Terfezia arenaria*

2.3.1. Préparation des échantillons

Les ascomés sont soigneusement nettoyés pour éliminer les particules de terre et mis à sécher à l'étuve, à température 40 °C, jusqu'à atteindre 20 jours, puis le séchage de terfez sont finement broyés à l'aide d'un broyeur jusqu'à l'obtention d'une poudre de couleur jaunâtre.

2.3.2. Extraction des substances bioactives

Nous avons utilisé deux méthodes d'extraction (macération et Soxhlet) afin d'optimiser les rendements.

2.3.2.1. Extraction par macération dans le méthanol

Elle consiste à mélanger dans un erlenmeyer 10 g de matière sèche (poudre d'ascomes desséchés) avec 100 mL de méthanol (**voire l'annexe 03**) et les laisser pendant 48 h à température ambiante et à l'obscurité. Les extraits méthanoliques obtenus sont filtrés, concentrés à l'aide d'un évaporateur rotatif pour chasser toute trace de solvant, L'extrait a été sécher dans l'étuve à 40 °C, puis gratter l'extrait sec, et on le met dans un flacon opac, puis conservés au réfrigérateur à 4 °C et à l'obscurité (**Neggaz, 2016**) (**Figure 09**).

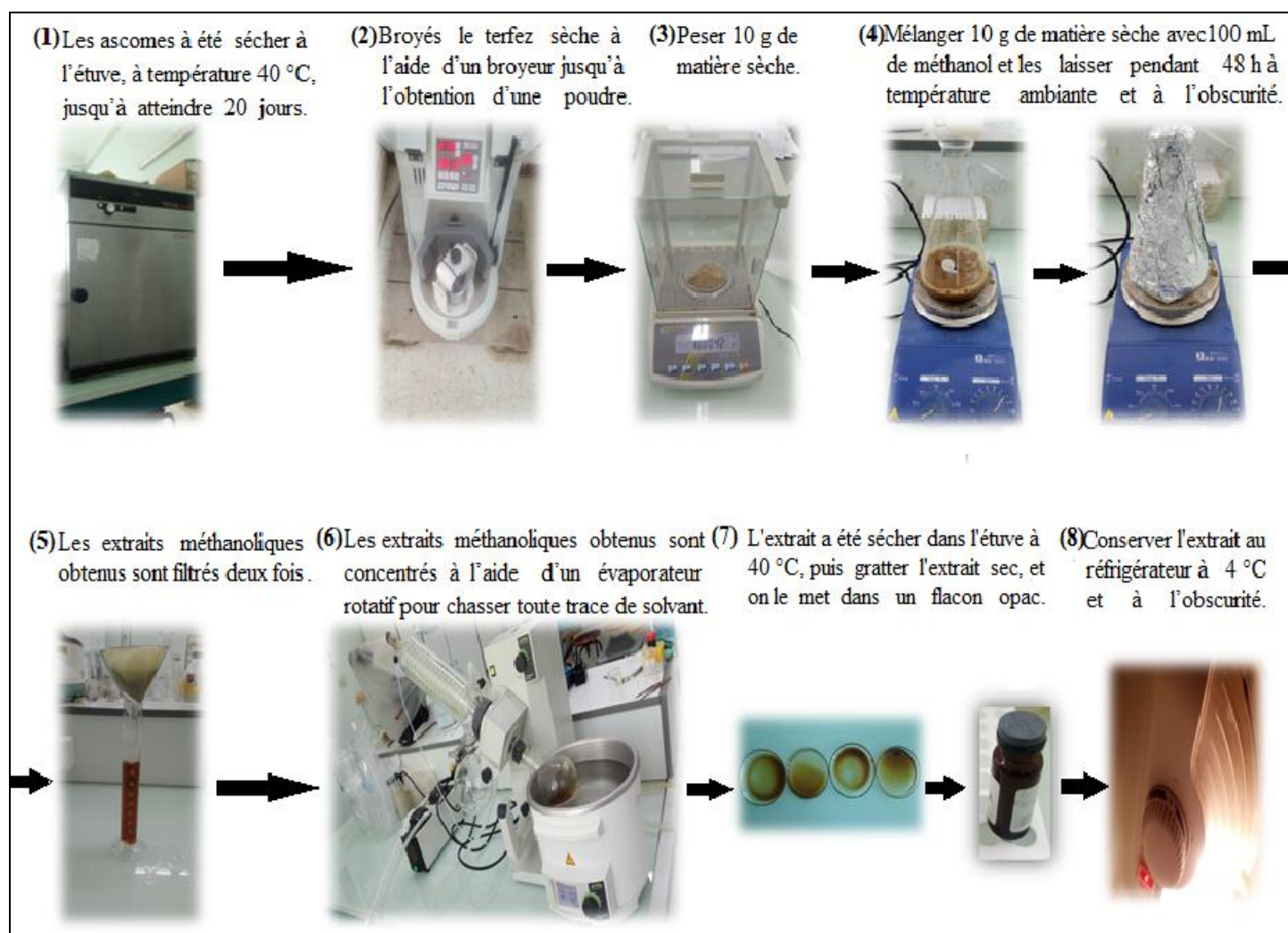


Figure 09. Le protocole d'Extraction par macération dans le méthanol (**Neggaz, 2016**).

2.3.2.2. Extraction au Soxhlet

2.3.2.2.1. Description et principe du Soxhlet

Un extracteur Soxhlet est un dispositif en verre utilisé en chimie analytique et organique qui permet d'effectuer une extraction en continu avec un solvant de produits chimiques contenus dans une matrice solide.

Il se compose d'un corps en verre (4) dans lequel est placée une cartouche en cellulose (5), d'un tube siphon (6 et 7) et d'un tube d'adduction (3). Le corps de l'extracteur est placé sur un ballon (2) contenant le solvant d'extraction. Les résidus à extraire sont placés dans l'extracteur surmonté d'un réfrigérant (9) (Figure 10).

L'échantillon, placé dans une cartouche poreuse à l'intérieur de l'extracteur, est traversé par les vapeurs de solvant. Celles-ci passent du ballon chauffé au tube adducteur puis se condensent dans le réfrigérant. Le condensat s'accumule dans le corps de l'extracteur jusqu'à atteindre le sommet du siphon, entraînant alors le retour du liquide dans le ballon. Au fil des cycles, le solvant s'enrichit en substances extraites jusqu'à épuisement de l'échantillon en substances d'intérêt. Par comparaison avec les macérations classiques, cette technique permet de réduire le temps d'extraction, d'une part, et requiert nettement moins de solvant et d'échantillon pour une efficacité d'extraction supérieure, d'autre part. L'extraction à chaud peut dégrader certaines substances chimiques (Luque de castro et Priego-Capote, 2009).

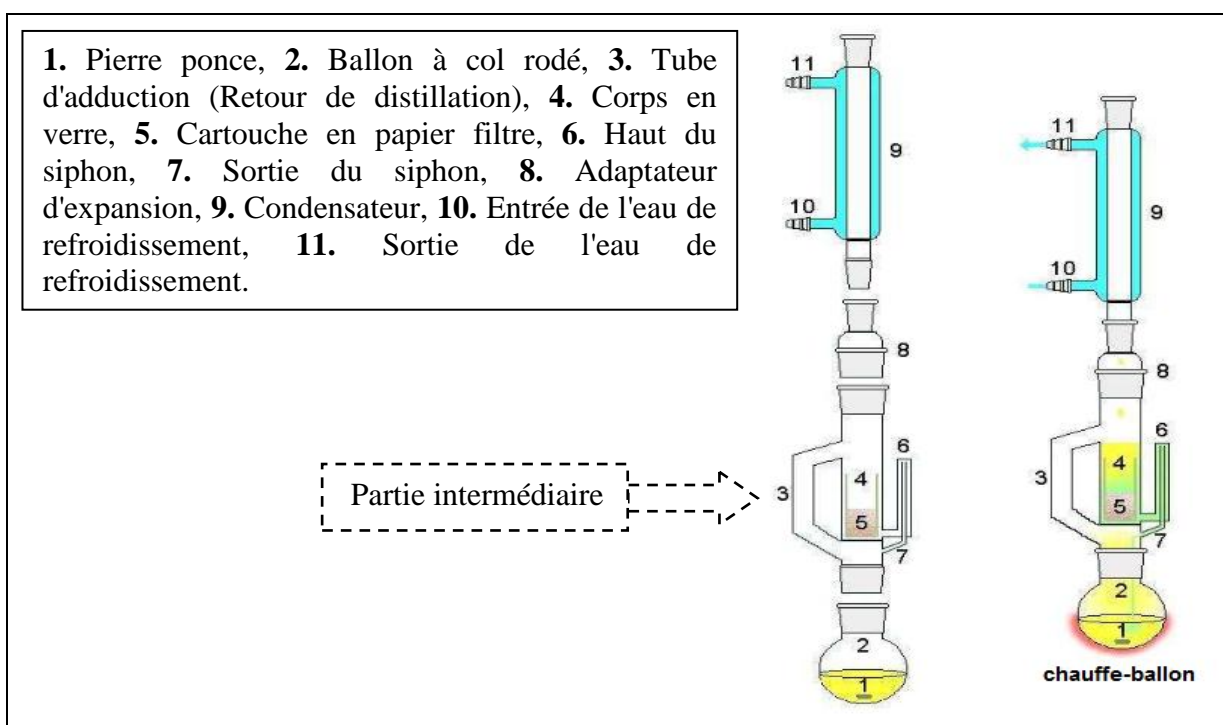


Figure 10. Représentation schématique d'un extracteur Soxhlet (Luque de castro et Priego-Capote, 2009).

2.3.2.2.2. Mode opératoire

L'extraction à l'aide du Soxhlet est une technique de référence recommandé par divers auteurs (**Schantz et al., 1977; Shu et al., 2000 ; Luque de Castro et Priego-capote, 2009**).

La matière sèche des ascomes de terpez est pesée puis introduite dans une cartouche confectionnée avec du papier filtre et adaptée à la dimension de l'appareillage.

L'extraction est effectuée avec un solvant organique à polarité croissante, du moins polaire: dichlorométhane (**Figure 11**). Le chauffe-ballon est réglé à une température supérieure à la température d'ébullition du solvant utilisé.

Au cours de l'extraction, 50g de poudre sont extrait avec 750 mL de dichlorométhane (**voire l'annexe 03**) pendant 24 heures. Le ballon contient quelque grains de pierre ponce (afin de réguler l'ébullition), une coloration jaune orangé du solvant apparait lorsque le solvant entre au contact avec la matière sèche contenue dans la cartouche. L'extraction est arrêtée lorsque le liquide entourant la cartouche devient clair, cette couleur indiquant que le solvant n'extrait plus rien du solide.

L'extrait dichlorométhane a été concentré sous vide à l'aide d'un évaporateur rotatif, L'extrait a été séché dans l'étuve à 40 °C, puis gratter l'extrait sec, et on le met dans un flacon opac, puis gardés au réfrigérateur à 4°C et à l'obscurité (**Neggaz, 2016**) (**Figure 12**).

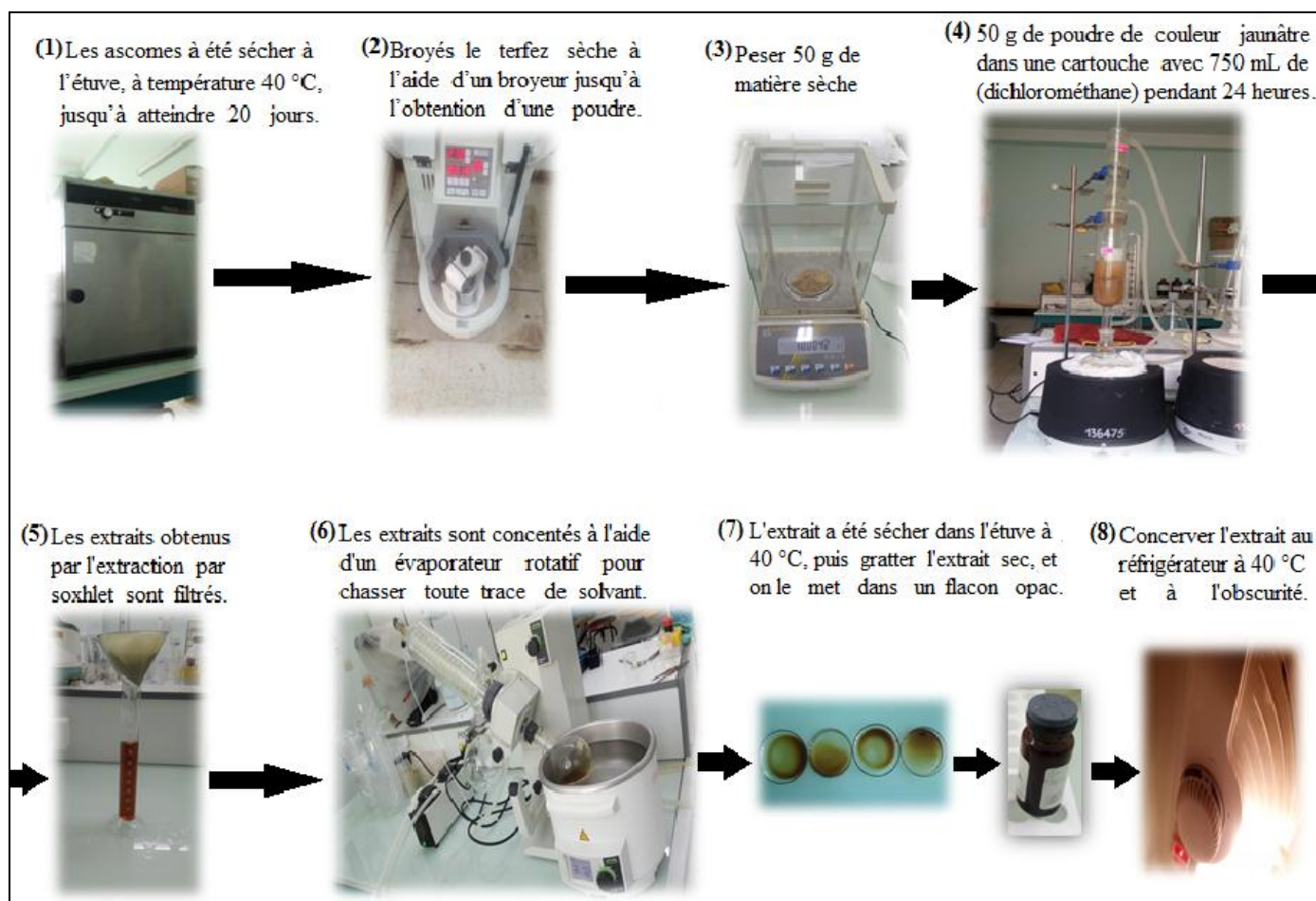


Figure 11. Le protocole d'Extraction au soxhlet dans le dichlorométhane (Neggaz, 2016).

2.4. Méthode de préparation des extraits

2.4.1. Pour l'extrait de macération

Nous avons diluée 200mg d'extrait dans 1ml du solvant pour la concentration 100%, pour la 50% diluée 100mg d'extrait dans 1ml du solvant, et pour 25% nous avons diluée 50mg dans 1ml du solvant, et en fine pour 12,5% nos avons diluée 25mg dans 1ml du solvant, dans cette cas nous avons utilisé le méthanol (**Figure 13**).

2.4.2. Pour l'extrait de soxhlet

Nous avons diluée 100mg d'extrait dans 1ml du solvant pour la concentration 100%, pour la 50% diluée 50mg d'extrait dans 1ml du solvant, et pour 25% nous avons diluée 25mg dans 1ml du solvant dans cette cas nous avons utilisé le (DMSO) (**Figure 12**).

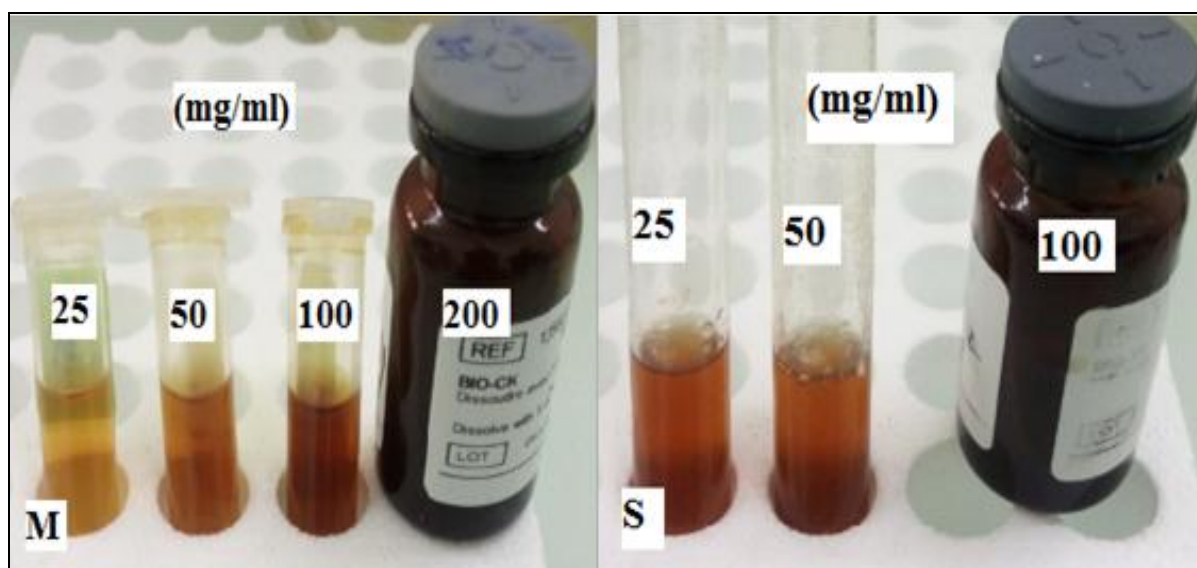


Figure 12. Les différentes concentrations des extraits dilués de (M) macération et (S) soxhlet.

2.5. Tests par les puits de l'activité antimicrobienne de l'extrait brut des ascomés desséchés et mûres de *Terfezia arenaria*

2.5.1. Tests antibactériens

2.5.1.1. Préparation de l'inoculum

Les souches bactériennes sont ensemencées par la méthode des stries d'épuisement sur (GN) pour obtenir des colonies isolées. Après une incubation d'une nuit à 37°C, 4 à 5 colonies bien isolées sont prélevées avec une anse et émulsionnées dans un tube contenant 10mL de bouillon nutritif. Après 24 heures d'incubation à 37°C, le tube de la suspension bactérienne est standardisé à l'aide du spectrophotomètre, la turbidité de la suspension à 625nm (la DO doit être comprise entre 0.08 et 0.1) Si c'est nécessaire, la turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de bouillon nutritif stérile, ou bien augmentée par l'allongement de la durée d'incubation.

2.5.1.2. Ensemencement sur boîtes de Pétri

20 mL de milieu (MH) en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre. L'épaisseur du milieu doit être de 4mm car une couche plus fine augmente la taille de la zone d'inhibition ce qui peut donner un faux résultat. Les boîtes sont introduites dans l'étuve à 37°C pendant 30 min avant de les ensemencer afin d'éliminer l'humidité.

1mL d'inoculum bactérien standardisé (la DO) compris entre 0.08 et 0.1 est aseptiquement déposé et étalé sur la surface du milieu à l'aide d'un étaloir stérilisé. Le liquide en excès est aspiré avec une pipette Pasteur stérile afin d'éliminer tout résidu d'inoculum.

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, 5 puits de 6mm de diamètre, pour l'extrait de macération avec le méthanol, sont fait dans chaque boîte testée, et 4 puits de 6mm de diamètre, pour l'extrait de soxhlet avec le (DMSO) (**voire l'annexe 08**), sont fait dans chaque boîte testée, Les puits dans les boîtes pour les témoins négative sont possédés en (DMSO) ou le méthanol uniquement selon l'extrait qui utilisée dans les tests.

- A l'aide d'une micropipette, Disposé dans chaque puits 25µl d'extrait, et le témoin négative 25µl aussi de (DMSO) ou le méthanol.
- Pour chaque souche, on prépare 4 boîtes (3 testées et 1 pour les témoins positive).

Les boîtes de Pétri sont laissées un quart d'heure à la température ambiante afin que le contenu des puits diffuse dans le milieu. Elles sont ensuite fermées par du ruban adhésif et incubées à 37°C pendant 24h.

2.5.2. Tests antifongiques

2.5.2.1. Tests sur les souches des champignons filamenteux

2.5.2.2. Préparation des suspensions sporales

Des implants mycéliens de 5mm de côté sont prélevés à partir des pré-cultures âgées de 4 à 7 jours, puis sont mis dans des tubes à essai contenant chacun 10mL d'eau physiologie stérile. Après agitation au Vortex, puis standardisé la (DO) compris entre 0.08 et 0.1 par le spectrophotomètre Si c'est nécessaire, la turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de l'eau physiologie stérile, ou bien augmentée par des implants mycéliens.

2.5.2.3. Ensemencement sur boîtes de Pétri

Une fois la suspension sporale préparée, 3 à 4 gouttes sont déposées au fond d'une boîte de Pétri de 90mm de diamètre, puis du milieu (PDA) en surfusion est coulé et homogénéisé par mouvement de huit. 5 puits de 6mm de diamètre, pour l'extrait de macération avec le méthanol, sont fait dans chaque boîte testée, et 4 puits de 6mm de diamètre, pour l'extrait de soxhlet avec le (DMSO), sont fait dans chaque boîte testée, Les puits dans les boîtes pour les témoins négative sont possédés en (DMSO) ou le méthanol uniquement selon l'extrait qui utilisée dans les tests.

- A l'aide d'une micropipette, Disposé dans chaque puits 25µl d'extrait, et le témoin négative 25µl aussi de (DMSO) ou le méthanol.
- Pour chaque souche, on prépare 3 boîtes testées.

Les boîtes de Pétri sont laissées un quart d'heure à la température ambiante, pour que le contenu des puits diffuse dans le milieu, puis fermées avec du ruban adhésif et incubées bien à 25°C.

2.5.3. Tests sur les levures

2.5.3.1. Préparation de l'inoculum

Les souches levuriformes sont ensemencées par la méthode des stries d'épuisement sur le milieu gélose nutritive en boîtes de Pétri. Après 72 heures d'incubation à 28°C, 4 à 5 colonies bien isolées sont prélevées avec une anse et émulsionnées dans un tube contenant 10mL de bouillon nutritif. Après 24 heures d'incubation à 25°C, est standardisée à l'aide du spectrophotomètre, la turbidité de la suspension à 625nm (la DO doit être compris entre 0.08 et 0.1). Si c'est nécessaire, la turbidité peut être diminuée en ajoutant plus de bouillon nutritif stérile, ou bien augmentée par allongement de la durée d'incubation.

2.5.3.2. Ensemencement sur boîtes de Pétri

20 mL du milieu MH Mueller-Hinton en surfusion sont coulés dans des boîtes de Pétri de 90mm de diamètre. Les boîtes sont introduites dans l'étuve à 25°C pendant 30 min avant de les ensemencer afin d'éliminer l'humidité. 1mL d'inoculum standardisé (la DO compris entre 0.08 et 0.1) est aseptiquement déposé et étalé sur la surface du milieu à l'aide d'un étaloir stérilisé. Le liquide en excès est aspiré avec une pipette Pasteur stérile afin d'éliminer tout résidu d'inoculum. A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, fait 5 puits de 6mm de diamètre, pour l'extrait de macération avec le méthanol, sont fait dans chaque boîte testée, et 4 puits de 6mm de diamètre, pour l'extrait de soxhlet avec le (DMSO), sont fait dans chaque boîte testée, Les puits dans les boîtes pour les témoins négative sont possédés en (DMSO) ou le méthanol uniquement selon l'extrait qui utilisée dans les tests.

- A l'aide d'une micropipette, Disposé dans chaque puits 25µl d'extrait, et le témoin négative 25µl aussi de (DMSO) ou le méthanol.
- Pour chaque souche, on prépare 4 boîtes (3 testées et 1 pour les témoins positive).

Les boîtes de Pétri sont laissées un quart d'heure à la température ambiante pour que le contenu des puits diffuse dans le milieu. Elles sont ensuite incubées à 28°C pendant 3 jours.

2.5.4. Méthode de mesure de la sensibilité des souches testées

La sensibilité des souches testées est déterminée en mesurant les diamètres des zones d'inhibition dans les trois directions perpendiculaires autour des puits, en boîtes de Pétri.

2.6. Dosage des polyphénols totaux et flavonoïdes

2.6.1. Dosage qualitatif

2.6.1.1. Chromatographique sur couche mince CCM des extraits

La chromatographie sur couche mince est une méthode physico-chimique rapide de contrôle dont l'adsorbant ou phase stationnaire est constituée d'une couche mince et uniforme, appliquée sur un support. La phase mobile migre à la surface de la plaque par capillarité (Diallo, 2005). Pour l'analyse des extraits du méthanol par l'extraction par macération et de la dichlorométhane par l'extraction par soxhlet, la silice 60 F254 Merck, 0,1 mm sur support d'aluminium (20 x 20 cm) a été utilisée comme phase stationnaire. Les plaques ont été déposées dans une cuve préalablement saturée par le système solvant. Ces extraits ont été analysés par plusieurs (CCM) en testant chaque fois un système de solvant de migration en comparaison avec des étalons (Quercétine, Acide Gallique) (Tableau 06) et (Figure 13). Après migration, les plaques ont été observées sous lampe (UV) à 254 nm et 366 nm.

Selon Mansar-Benhamza. (2013). Les substances phénoliques sont des molécules actives et absorbent UV à 366 nm. Le rapport frontal (RF) pour chaque tâche a été calculé selon la formule suivante :

$$RF = \frac{\text{Distance parcourue par la substance}}{\text{Distance parcourue par le solvant}}$$

Tableau 06. Systèmes solvants utilisés dans les séparations par (CCM) (Mansar-Benhamza, 2013).

Les systèmes solvants	Abréviation	Rapport (v/v)
Chloroforme /Méthanol.	CM	(8/2)
Acétate d'éthyl/Méthanol/Eau.	AME	(7/1,5/1,5)
Acétate /n-Butanol.	AB	(9/1)
Acétate d'ethyl/Ac acétique /Eau.	AAE	(8/1/1)
Acétate d'éthyl /Ether diéthylique.	AE	(2/8)
Dichlorométhane/Méthanol.	DM	(8/2)
Dichlorométhane/Acétate d'éthyl.	DA	(9/1)
Acétate d'éthyl/Acide formique/Eau.	AFE	(8/1/1)



Figure 13. Les différents Systèmes des solvants utilisés dans les séparations par (CCM) (Mansar-Benhamza, 2013).

La révélation a été faite selon la coloration des spots puisqu'il existe une relation étroite entre la fluorescence et la structure chimique des substances (Seghiri, 2009) (Tableau 07).

Tableau 07. Composés phénoliques identifiés par (CCM) (Markham, 1982).

Couleurs sous UV 366 nm	Classes de polyphénols possibles
Mauve	Anthocyanidine-3-glycosides
Violet	Flavones
Bleu	Ac Phénol
Bleu	Ac Phénol
Bleu jaunâtre	/
Bleu blanc fluorescent	Flavonols, Flavones, Isoflavones et Flavanones
Bleu pale	Ac Phénol
Vert	Flavonols, Flavonones et Aurones
Jaune	Flavonols
Jaune grisâtre	/
Jaune pale	Flavonols
Orange	Anthocyanidine-3-glycoside
Rouge	Anthocyanidine-3-glycoside
Rouge vif	Anthocyanidine-3-glycoside
Gris	/
Gris sombre	/
Bleu sombre	/
Rose	Anthocyanidine-3,5-diglycosides
Rose pale	Anthocyanidine-3,5-diglycosides

Ce dosage qualitatif a été renforcé par un dosage quantitatif des principaux métabolites secondaires.

2.6.2. Dosage quantitatif

2.6.2.1. Dosage des polyphénols totaux

L'estimation de la teneur en composés phénoliques extractibles totaux peut être réalisée par la méthode de Folin-Ciocalteu (**Waterman et Mole, 1994**). Principe Le réactif de Folin-Ciocalteu est constitué par un mélange d'acide phosphotungstique et d'acide phosphomolybdique. qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) 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.

2.6.2.1.1. Réactifs et extraits utilisés (annexe 04)

- Un polyphénol témoins : l'acide gallique pour la réalisation de la gamme d'étalonnage en milieu aqueux.
- Réactif de Folin-Ciocalteu : 5 ml folin +45 ml l'eau distillé.
- Bicarbonate de sodium : 3,75 g dissous dans 50 ml.
- Les extraits organiques ont été dissous dans le méthanol absolu pour l'extrait obtenu par macération et pour l'extrait obtenu par soxhlet a été dissous dans le (DMSO).

2.6.2.1.2. Mode opératoire

A-Préparation de la gamme d'étalonnage de l'acide gallique

Une gamme de concentrations d'acide gallique allant de 20 à 200 $\mu\text{g/ml}$ a été préparée à partir d'une solution mère de 200 $\mu\text{g/ml}$ de concentration.

B-Analyse du standard

- Introduction de 0.1 à 1 ml de la solution mère de l'acide gallique dans une série de tubes à essai, le volume final dans chaque tube a été complété à 1 ml par addition de l'eau distillée

(Voir tableau 08 et l'annexe 05).

- On prend 0,1 ml de chaque aliquote dans une série de tubes à essai.
- On Ajoute 0,25 ml du réactif de Folin-Ciocalteu à chaque tube, après 2 min on ajoute 1,25 ml de la solution de bicarbonate de sodium dans chaque tube;
- Agitation puis incubation à l'obscurité pendant 1 h;

- La lecture des absorbances se fait à 760 nm à l'aide de spectrophomètre.

Tableau 08. Les concentrations préparées de l'acide gallique.

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume pris de la solution mère (en ml)	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Volume d'eau ajouté	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1	0
Concentration finale de l'acide gallique (en µg/ ml)	20	40	60	80	100	120	140	160	180	200

C- La préparation des blancs

- le blanc utilisé pour le dosage de l'acide gallique : On prend 0,5 ml de l'eau distillée + 0,25 ml réactif de folin + 1,25 ml (Na_2CO_3)
- le blanc utilisé pour le dosage des extraits obtenus par macération et par soxhlet : on prend 0,1 ml du MeOH pour l'extrait de macération ou DMSE pour l'extrait de soxhlet + 0,4 ml de l'eau distillée + 0,25 ml réactif de folin + 1,25 ml (Na_2CO_3)

D- Analyse des extraits

Dans 3 tubes à essai on met 0,1 ml d'extrait dilué 10 fois et on les ajouts :

- 0,4 ml de l'eau distillée.
- 0,25 ml du réactif de folin.
- Après 2 min on ajoute 1,25 ml de Na_2CO_3 .
- Après 40 min d'incubation, on mesure l'absorbance à 760 nm à l'aide de spectrophomètre.

La concentration en composés phénoliques extractibles totaux est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage de l'acide gallique.

2.6.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

La méthode la plus utilisée pour l'estimation du taux des flavonoïdes dans des différents extraits est celle décrite par **Lamaison et Carnat. (1991)** et cité par **Bahorun. (1997)**. La coloration jaunâtre donnée par cette méthode est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes.

2.6.2.2.1. Réactifs et extrait utilisés (annexe 04)

- 2 g de Chlorure d'aluminium ($AlCl_3$) dissous dans 100 ml de méthanol absolu.
- Solution mère du standard : 0,4mg de quercétine dissous dans 100 ml de méthanol absolu.
- Extraits Brut : l'extrait organique sont dissous dans le méthanol pour l'extrait de macération et dans le (DMSO) absolu pour l'extrait de soxhlet.

2.6.2.2.2. Mode opératoire**A-Préparation de la gamme d'étalonnage**

Préparer une gamme de 9 concentrations de quercétine allant de 2,5 à 40 $\mu\text{g/ml}$ à partir d'une solution mère de 40 $\mu\text{g/ml}$ de concentration (400 μg de quercétine dissous dans 10 ml de méthanol) (voir le tableau 09 et l'annexe 05).

Tableau 09. Différents Concentration de la quercétine.

N° des tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Volume pris de la solution mère (en ml)	0,2	0,4	0,8	1,1	1,5	1,8	2,3	2,6	3
Volume ajouté de méthanol (en ml)	2,8	2,6	2,2	1,9	1,5	1,2	0,7	0,4	0
Concentration finale de quercétine(en $\mu\text{g/ ml}$)	2,5	5	10	15	20	25	30	35	40

B-Analyse du standard

Des aliquotes de 0,2 à 3,0 ml de la solution mère de quercétine ont été introduites dans une série de tubes à essai, le volume finale dans chaque tube a été complété à 3 ml par addition de méthanol absolu.

- Prélever 1 ml de chaque tube et transféré à un autre.
- Ajouter 1 ml de la solution méthanolique du chlorure d'aluminium à 2 %.
- Après 10 min, lire l'absorbance à 430 nm à l'aide de spectrophomètre.

C-Blanc de la quercétine

- 2 ml de méthanol.

D-Analyse des extraits

- Préparer trois tubes à essai.
- Introduire 0,5 ml d'extrait dans chaque tube.
- Ajouter 0,5 ml de méthanol absolu pour l'extrait de macération ou de (DMSO) absolu pour l'extrait de soxhlet dans chaque tube.

- Additionner à chaque tube, 1 ml de la solution méthanolique du chlorure d'aluminium à 2 %.
- Après 10 min, lire l'absorbance à 430 nm.

E-Blanc de l'extrait

- 1ml de (MeOH) + 1ml du chlorure d'aluminium à 2 %.

F-Expression des résultats

La concentration en flavonoïdes est déterminée en se référant à la courbe d'étalonnage obtenue en utilisant la quercétine comme standard.

2.7. Analyse statistique des résultats

Les résultats de l'activité antimicrobienne ont été représentés sous la forme d'histogrammes et moyenne \pm écart type. Ces calculs ont été effectués à l'aide du logiciel OriginPro 8.6 32Bit d'analyse et de traitement statistique des données et les résultats de l'activité des antibiotiques et les résultats du dosage ont été effectués à l'aide du Microsoft Excel 2010.

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Identification des espèces de Terfez

La comparaison des caractères morphologiques et structuraux (structures morphologiques, macroscopiques et microscopiques), avec les différentes descriptions rapportées par **Trape. (1979)**; **Awameh et Alsheikh. (1980a)**; **Janex-Favre et al., (1988)**; **Fortas. (1990)**; **Fortas et al., (1990)**; **Khabar et al., (1994)**; **tadja. (1996)**; **Bessah, (1999)**; **Khabar. (2001)**; nous permettent de conclure que les Terfez acheté appartiennent au de genre *Terfezia* à savoir :

Terfezia arenaria

1.1. Description morphologique et anatomique de l'espèce achetée

1.1.1. Aspects généraux des Terfez achetée

A- L'ascocarpe

L'ascocarpe à forme lobée et présentant un pied à sa base (**Figure 14**). L'aspect général est globuleux avec une apparence turbinée, le diamètre varie de 4,5 à 8 cm. L'odeur est très caractéristique puissant et agréable.



Figure 14. L'ascocarpe de déférente forme de terfez (**Sidali et zinelabidin 2018**).

B-Péridium

La couleur du péridium est de couleur marron passant à noire la surface est relativement lisse et glabre, hérissée de minuscule pyramide de 3 à 4 faces, forant des petites écailles polygonales (**Figure 15**).



Figure 15. Péridium de *Terfezia arenaria* (Sidali et zinelabidin 2018).

1.1.2. Structure macroscopique

L'organisation structurelle de la truffe est très particulière, car elle résulte d'une adaptation à la vie souterraine (**Bouchet et al., 1999**). L'examen d'une coupe transversale, à l'aide d'une loupe binoculaire à un G x 10, révèle que les Terfez achetée se composent de deux couches :

- A l'extérieur, le péridium représente une enveloppe externe, son épaisseur est de 0,5 à 1 mm, de couleur pâle blanc- jaunâtre à marron.
- La chair (Gléba) est de couleur blanche, charnue, parcourue de petites veines (sillons) de couleur pâle jaunâtre. Les truffes comportent une enveloppe externe ou péridium, visible extérieurement sous forme d'écailles polygonales, entourant une Gléba interne Correspondant au tissu fertile (**Delmas, 1983**).



Figure 16. Coupe transversale de *Terfezia arenaria* sous la loupe binoculaire Gx10 (Sidali et zinelabidin 2018).

1.1.3. Structure microscopique

L'examen microscopique de la Gléba de Terfez mature, montre qu'elle est formée par un nombre important de mycéliums placés sans ordre et contenant des ascospores (**Figure 17**).

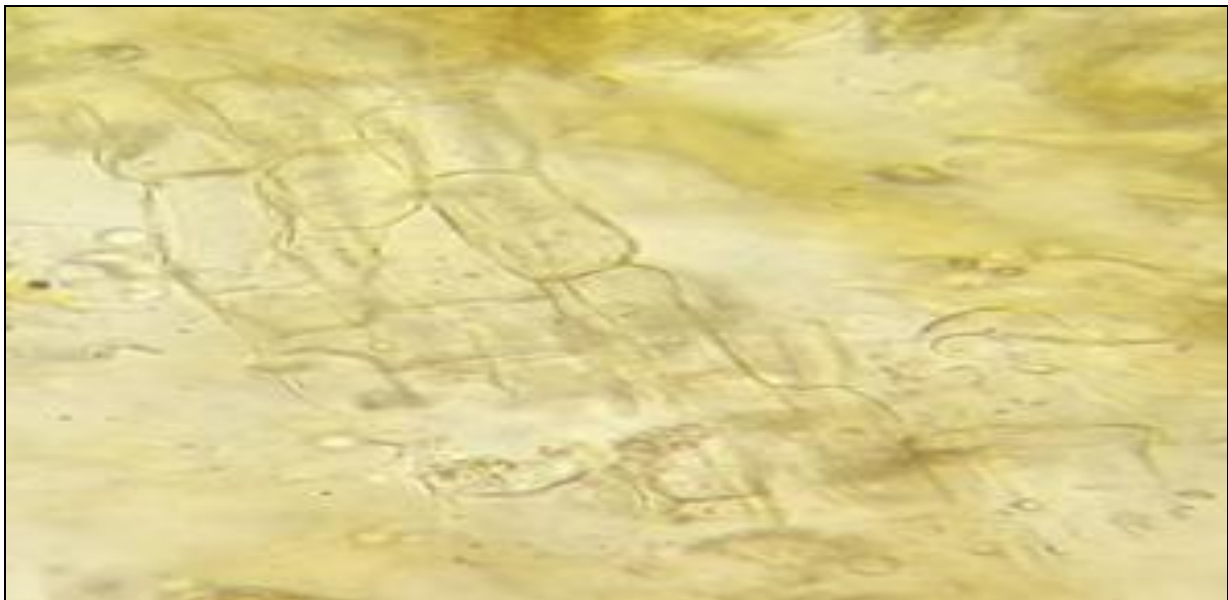


Figure 17. Structure microscopique de la gléba de *Terfezia arenaria* fraîche Gx 40 (Sidali et zinelabidin 2018).

Les hyphes mycéliens se ramifient et l'ensemble acquiert une forme plus ou moins annulaire. La structure est dense, formée par un nombre très élevé de veines renferment des asques. Ces descriptions convergent avec celles mentionnées par **janex-favre et al. (1988)** et **khabar**.

(1994), qui ont montré que les terfez possèdent un périidium lisse, une gléba comprenant des nodules fertiles, dégagés dans un réseau de veines stériles de structure dense.

1.2. Etude macro et microscopique des espèces de Terfez achetée *Terfezia arenaria*

Le corps fructifères étudiés ont une couleur marron foncée; passant à la couleur noire ; présentent un pédoncule à la base.

Diamètre de l'ascocarpe : 62,8 mm.

Configuration de la surface : lisse; glabre.

Le Périidium : présence épais de couleur brun à marron foncé.

La gléba : couleur brin-rouge, marbrée à rose.

Le nombre des spores : (6-8).

L'asque: subarrondi de dimension 78 x69 μm .

L'ascospore: de forme sphérique de dimension 19 x19 μm .



Figure 18. Mesure précise de l'ascocarpe de la terfez (Sidali et zinelabidin 2018).



Figure 19. Morphologie des ascocarpes de *Terfezia arenaria* (P) a Périidium noir foncé et (G) à gléba rose (Sidali et zinelabidin 2018).

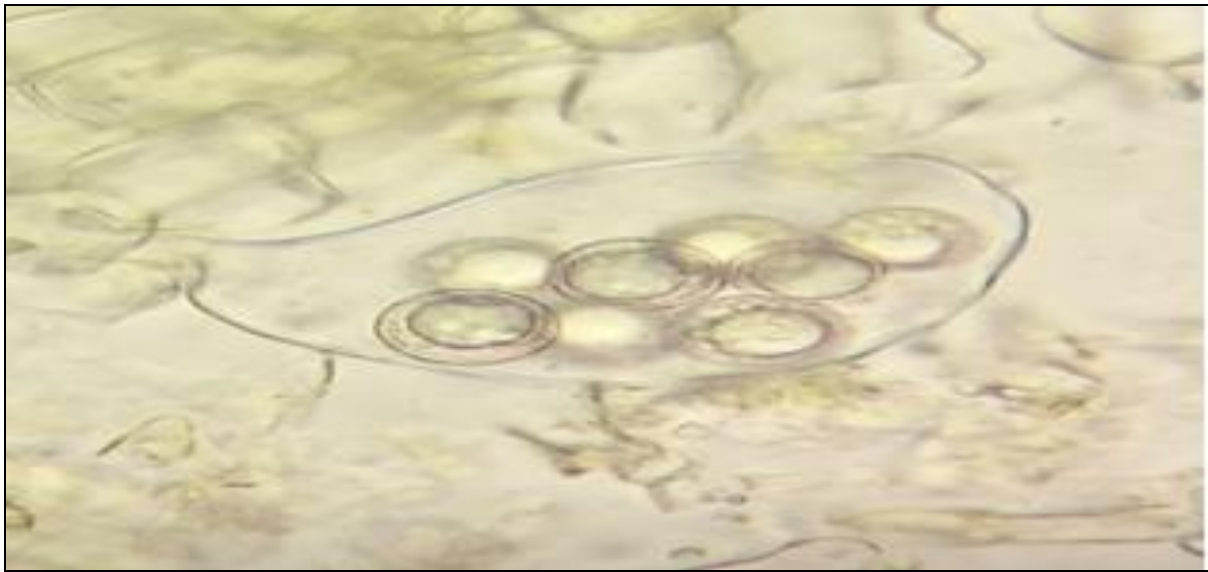


Figure 20. Morphologie des ascospores de la *Terfezia arenaria* fraîche Gx 40 (Sidali et zinelabidin 2018).

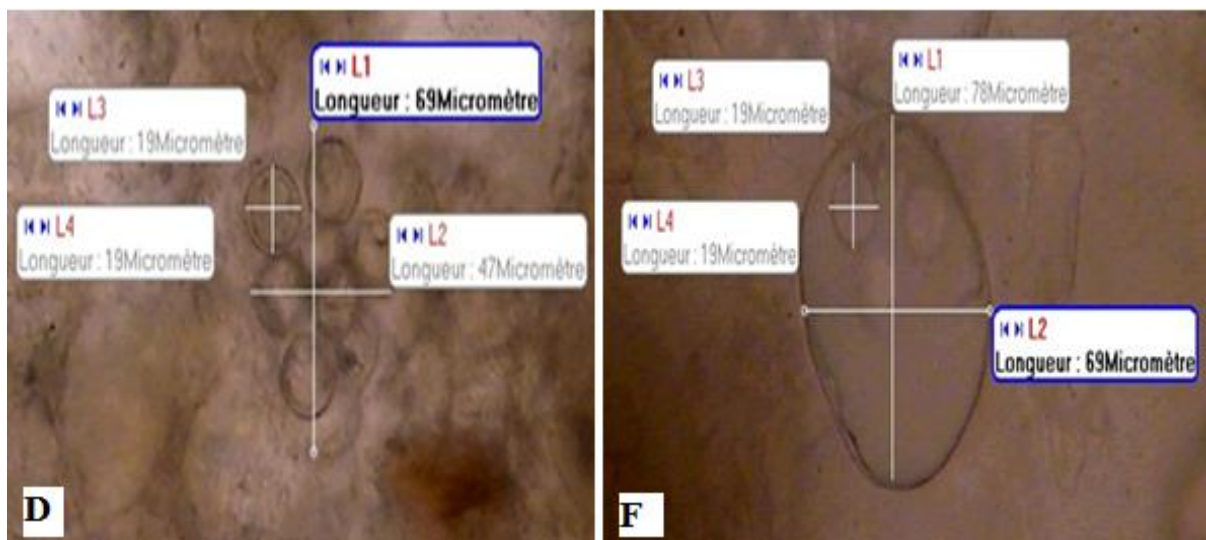


Figure 21. Morphologie des ascocarps et des ascis et les ascospores de Terfez noir *Terfezia arenaria* (D) Diamètres de l'asc et l'ascospore de *Terfezia arenaria* desséchées Gx 40 et (F) Diamètres de l'asc et l'ascospore de *Terfezia arenaria* fraîche Gx 40 (Sidali et zinelabidin 2018).

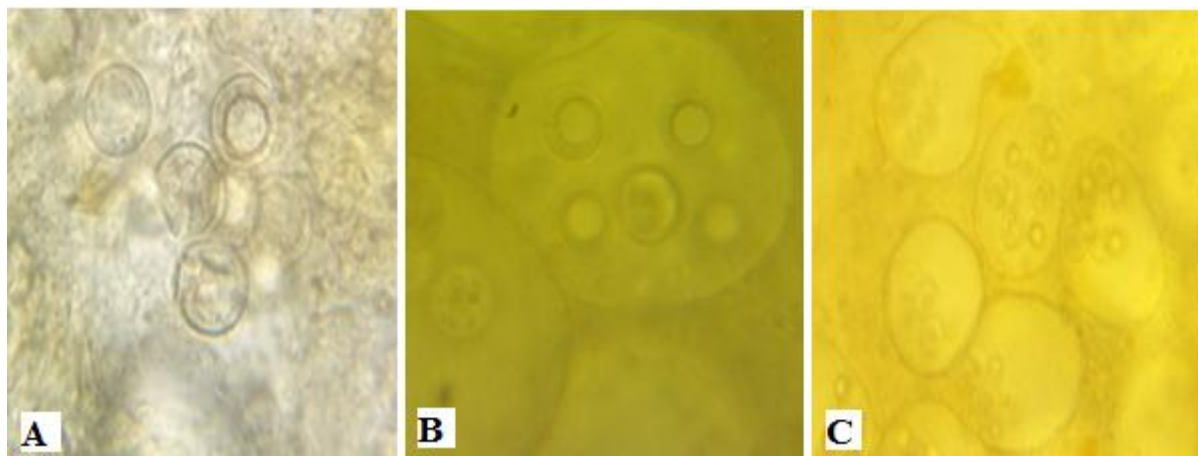


Figure 22. Coloration des asques de *Terfezia arenaria* par réactif de Melzer en différents temps (Sidali et zinelabidin 2018).

(A) Coloration des asques de *Terfezia arenaria* par réactif de Melzer Se colore normal à Gx100 après 10 min.

(B) Coloration des asques de *Terfezia arenaria* par réactif de Melzer Se colore en jaune à Gx100 après 24h.

(C) Coloration des asques de *Terfezia arenaria* par réactif de Melzer se Colore en jaune orangé à Gx40 après 48h.

2. Résultats d'extraction des substances bioactives par macération et Soxhlet

Le choix de la méthode d'extraction est très important avant d'effectuer *in vitro* les tests biologiques Il dépend de la nature des composés à étudier, du solvant utilisé et d'autres facteurs tels la température et le rapport quantité de matière au volume du solvant.

Les solvants d'extraction couramment utilisés sont des alcools (méthanol dans notre étude). Cependant, les mélanges d'alcool/ eau sont recommandés pour extraire certains composés très polaires tels que les composés phénoliques qui ne peuvent pas être complètement extraits avec les solvants organiques purs (Naczk et Shahidi., 2004) c'est le cas dans notre travail où nous avons utilisé le méthanol, Les solvants moins polaires comme le dichlorométhane .

Nous avons donc testé deux types d'extraction (extraction par macération, extraction au Soxhlet) et deux types de solvants (méthanol, dichlorométhane) afin de déterminer la meilleure technique d'extraction des substances bioactives contenues dans

les ascomes desséchés de *Terfezia arenaria*.

Les rendements d'extraction ont été déterminés à partir du rapport de la masse de l'extrait obtenu sur la masse de poudre d'ascomes desséchés utilisée. Les résultats du calcul du rendement, l'aspect ainsi que la couleur de chaque extrait obtenus sont regroupés dans la **Figure 23**, et le **Tableau 10**.

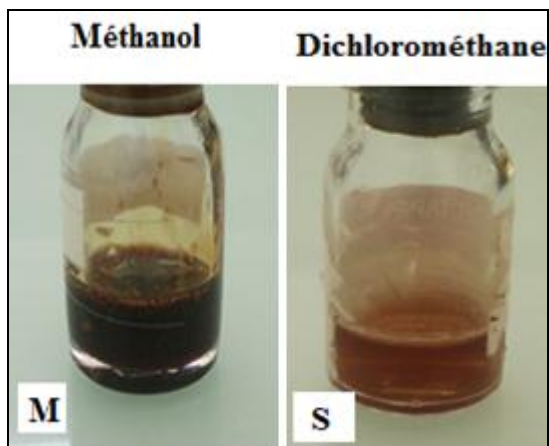


Figure 23. L'aspect des extrais obtenus par l'extraction par (M) macération et (S) soxhlet (Sidali et zinelabidin 2018).

Tableau 10. Rendement, aspect et la couleur des extraits de la méthanol et dichlorométhane d'ascomes desséchés de *Terfezia arenaria*, obtenus par macération et soxhlet.

L'extrais	Masse (g)	Rendement(%)	Aspect	Couleur
Macération (Méthanol)	1,55	15,5	Visqueux	Marron
Soxhlet (Dichlorométhane)	0,24	0,48	Mielleux	Brun

2.1. Extraction par macération dans le méthanol

La macération est une méthode d'extraction liquide-solide qui s'effectue à température ambiante. En général, c'est une méthode traditionnelle couramment employée pour l'extraction des composés phénoliques (polyphénol) qui ont un fort pouvoir antioxydant (Budic-Letoc *et al.*, 2005; Spigno et De Paveri, 2007).

Les résultats du rendement d'extraction ont montré que le rendement de l'extrait méthanolique est élevé (15,5%) de l'extrait de *Terfezia arenaria*, cet extrait de couleur marron et à aspect visqueux dégage une forte odeur. Des résultats analogues sont rapportés dans de nombreux travaux (Dennouni, 1996; Neggaz, 2010; Dib-

Bellahouel et Portas, 2011; Dib-Bellahouel, 2012; Neggaz et Portas, 2013).

Cette extraction réalisée à température ambiante et l'épuisement du solvant à pression réduite permettent d'empêcher la dénaturation des composés bioactifs ou leur modification probable contrairement à d'autres méthodes d'extraction qui utilisent des températures élevées qui dépasse les 40 °C.

2.2. Extraction par soxhlet dans le dichlorométhane

L'utilisation de solvants moins polaires dans cette méthode d'extraction par rapport à la macération a permis de séparer les composés contenus dans les ascomes desséchés de *Terfezia arenaria*. Cette méthode est couramment employée et appréciée pour obtenir un bon rendement d'extraction de polyphénols et effectuer des extractions en continu (**Escribano-Bailôn et Santos-Buelga, 2003; Al-Bandak et Oreopoulou, 2007**).

Le résultat obtenu révèlent que le rendement de l'extrait à dichlorométhane est très faible (0,48%) Ce résultat rejoint ceux de **Hamza et al. (2013)**.

En conclusion, parmi les deux méthodes d'extractions testées, l'extraction par macération semble être la meilleure méthode qui donne de rendement le plus élevé (15.5%). bien que la quantité de *Terfezia arenaria* en poudre dans la méthode de macération soit inférieure aux autres méthodes d'extraction.

3. Etude de l'activité antimicrobienne de différents extraits d'ascomes desséchés de *Terfezia arenaria*

3.1. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait méthanolique

3.1.1 Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique

L'activité antibactérienne a été évaluée *in vitro* sur cinq souches bactériennes (trois à Gram négatif *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 23853 et *Salmonella enterica* ATCC 14028 et deux à Gram positif *Enterococcus faecalis* ATCC 61299 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 par la méthode de diffusion en milieu gélosé (méthode de puits). Les résultats des différents tests présentés dans la **Figure 24** et illustrés par les **Figure 25 à 29**.

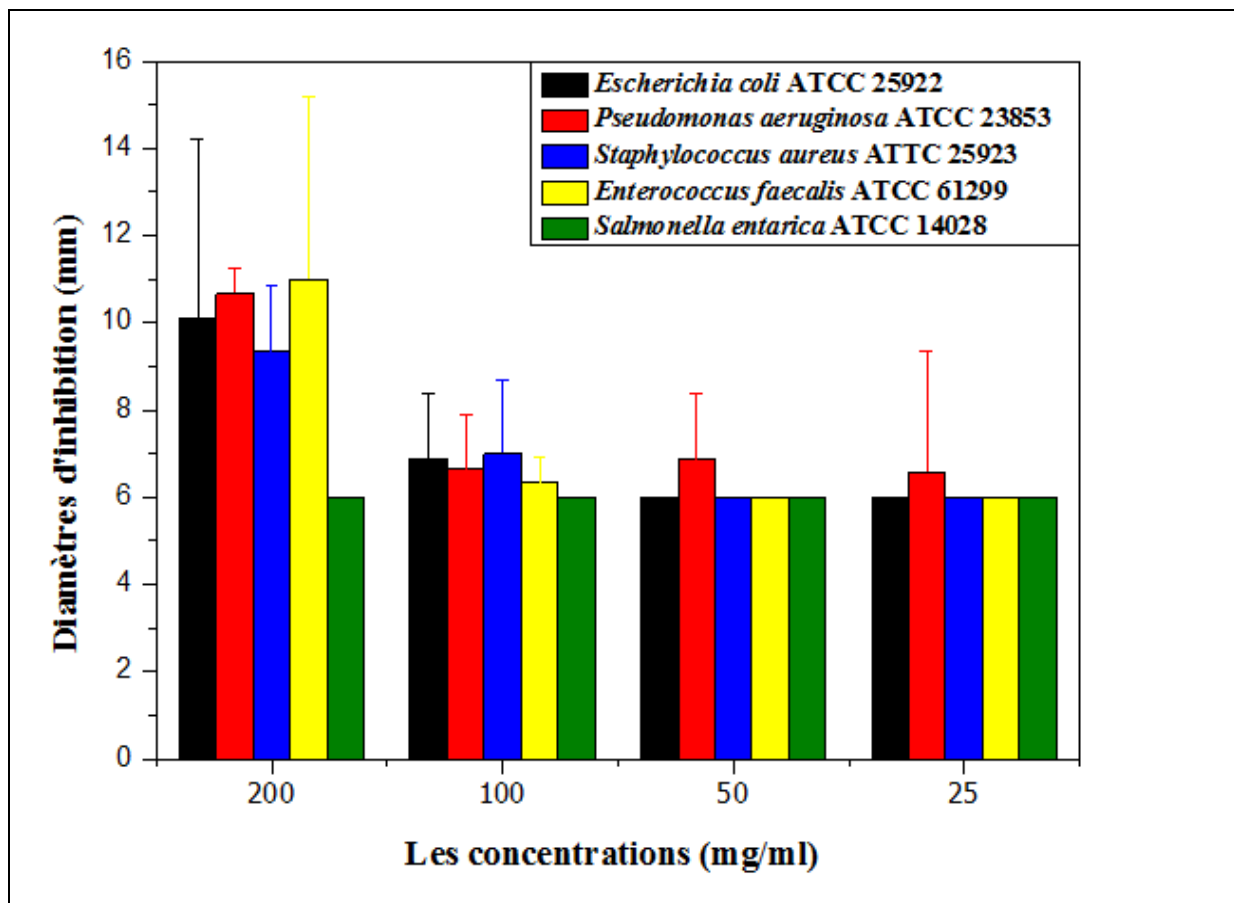


Figure 24. Histogramme représente diamètres d'inhibitions de l'activité antibactérienne de Différentes concentrations de l'extrait brut obtenu par méthode de macération.

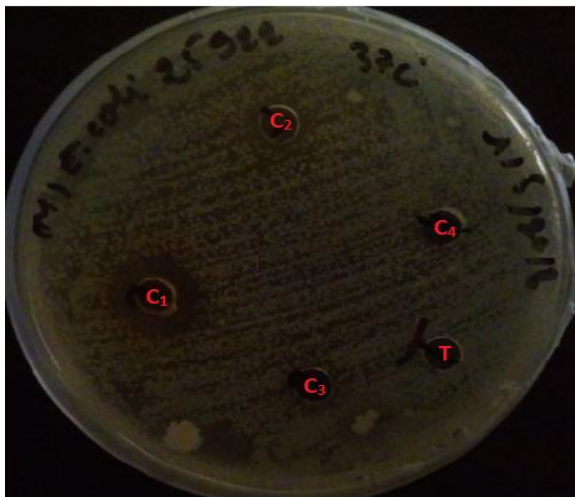


Figure 25. L'activité antibactérienne *Escherichia coli* ATCC 25922.



Figure 26. L'activité antibactérienne *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23853.

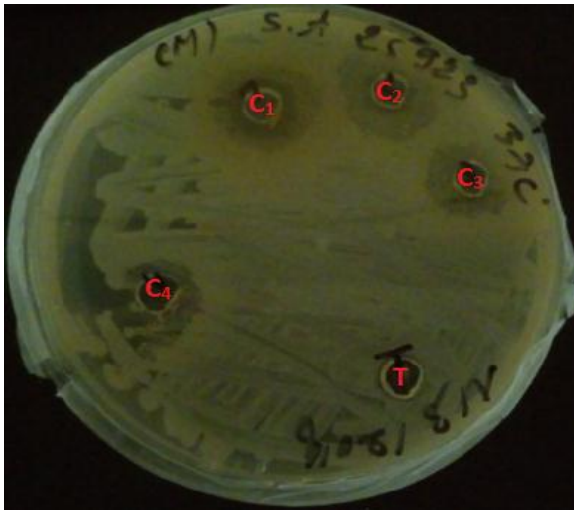


Figure 27. L'activité antibactérienne *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

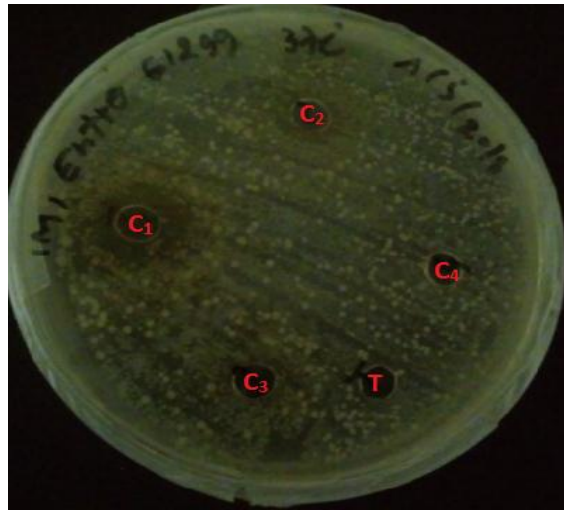


Figure 28. L'activité antibactérienne *Enterococcus faecalis* ATCC 61299.

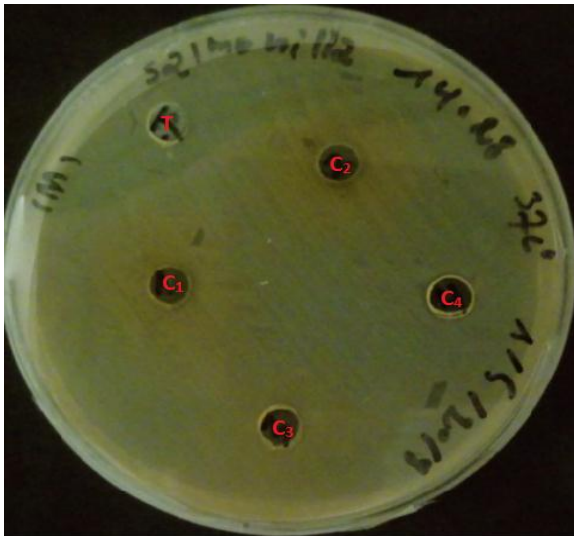


Figure 29. L'activité antibactérienne *Salmonella enterica* ATCC 14028.

A travers des résultats obtenus, nous avons constaté que les concentrations 25 et 50 mg/ml de l'extrait brut ne montrent aucune activité antibactérienne vis- vis des bactéries de références testées, une faible activité antibactérienne a été constatée contre la souche *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 23853; et en ce qui concerne la concentration 100 mg/ml, on remarque une légère activité antimicrobienne contre les *Enterococcus faecalis* ATCC 61299, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Escherichia coli* ATCC 25922, une légère activité antibactérienne a été remarquée aussi vis-à-vis des souches suivantes *Enterococcus faecalis* ATCC 61299, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 23853 et *Escherichia coli* ATCC 25922 à une concentration de 200 mg/ml d'extrait

dont le diamètre peut atteindre 11 mm. On constate que la souche *Salmonella enterica* ATCC 14028 est résistante vis-à-vis des toutes les concentrations testés.

3.1.2. Résultats de l'activité antifongique de l'extrait méthanolique

L'activité antifongique a été évaluée *in vitro* sur trois souches fongiques (*Aspergillus niger*, *Pinicillium* et *Candida albicans* ATCC 10231) par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats des différents tests présentés dans la **Figure 30** et illustrés par les **Figure 31 à 33**.

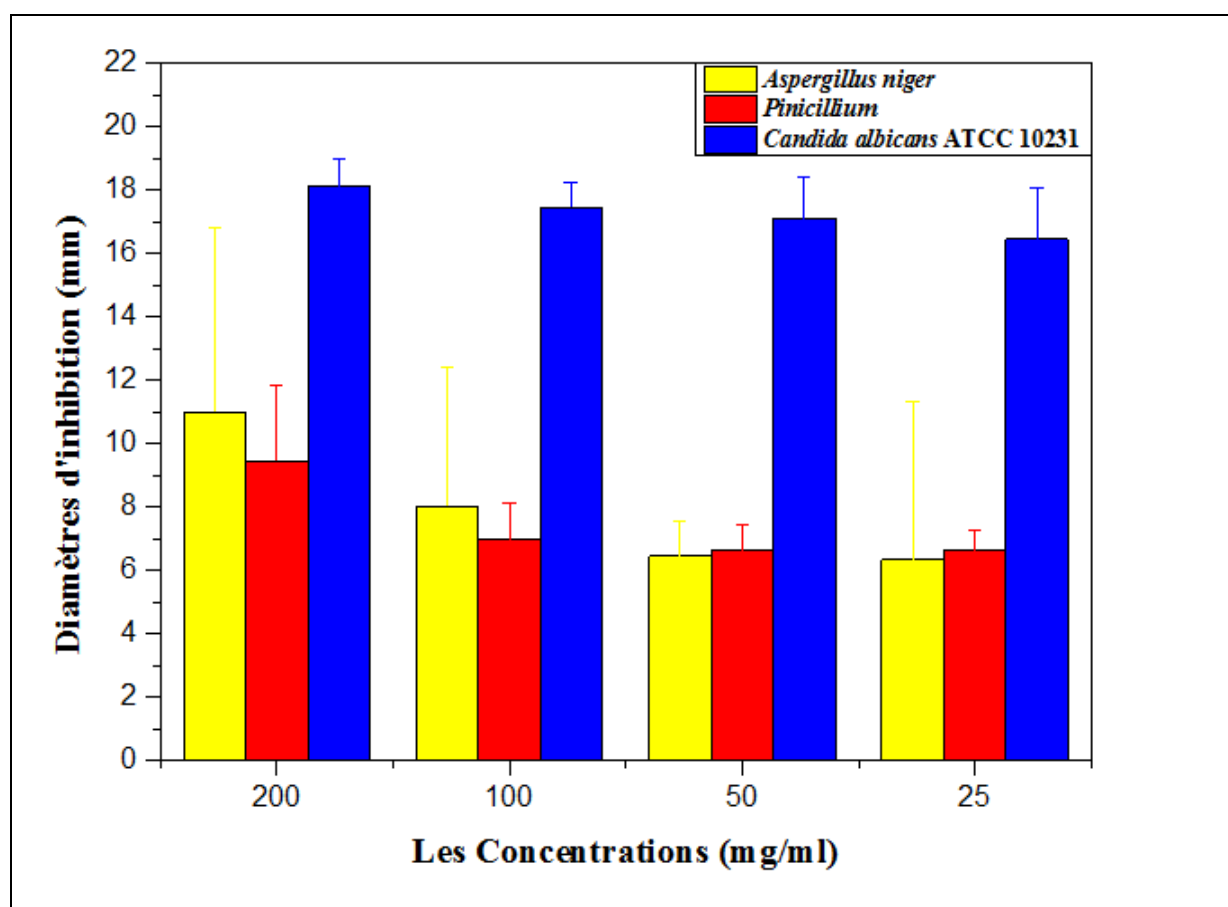


Figure 30. Histogramme représente diamètres d'inhibitions de l'activité antifongique de Différentes concentrations de l'extrait brut obtenu par méthode de macération.

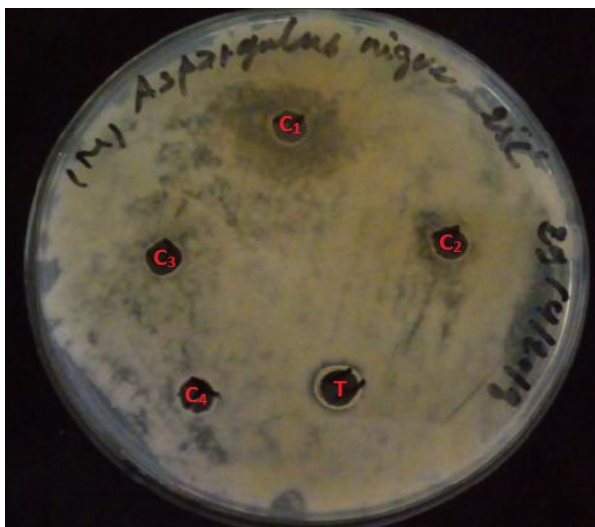


Figure 31. L'activité antifongique *Aspergillus niger*.

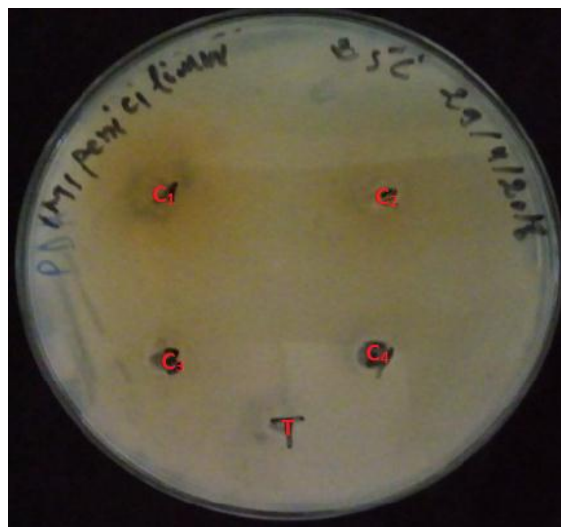


Figure 32. L'activité antifongique *Penicillium*.

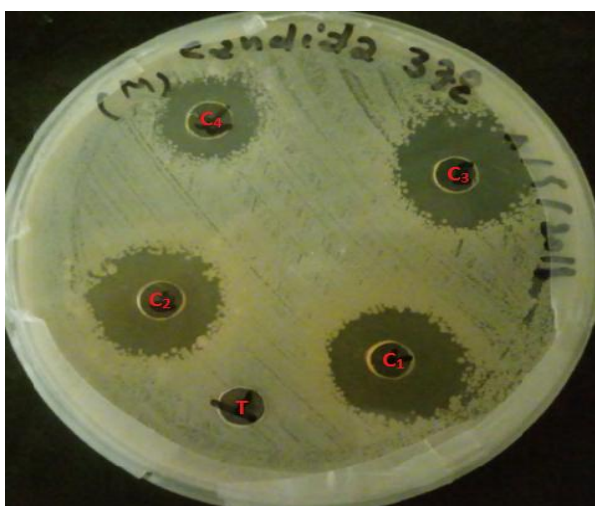


Figure 33. L'activité antifongique *Candida albicans* ATCC 10231.

L'extrait brut obtenu par extraction par macération présente une activité antifongique très intéressante pour toutes les concentrations 25, 50, 100 et 200 mg/ml, dont laquelle nous avons remarqués une augmentations progressive de l'activité antifongique vis-à-vis des souches fongique testés sauf que pour la souche *Candida albicans* ATCC 10231 on constate une forte activité antifongique pour toutes les concentration testés avec un diamètre d'inhibition qui peut atteindre les 18 mm pour la concentration de 200 mg/ml de l'extrait brut.

3.2. Résultats de l'activité antimicrobienne de l'extrait brut obtenu par la méthode de Soxhlet

3.2.1. Résultats de l'activité antibactérienne de l'extrait brut obtenu par la méthode de Soxhlet

L'activité antibactérienne a été évaluée *in vitro* sur quatre souches bactériennes (deux à Gram négatif *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23853 et deux à Gram positif *Enterococcus faecalis* ATCC 61299 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats des différents tests présentés dans la **Figure 34**, et illustrés par les **Figure 35 à 38**.

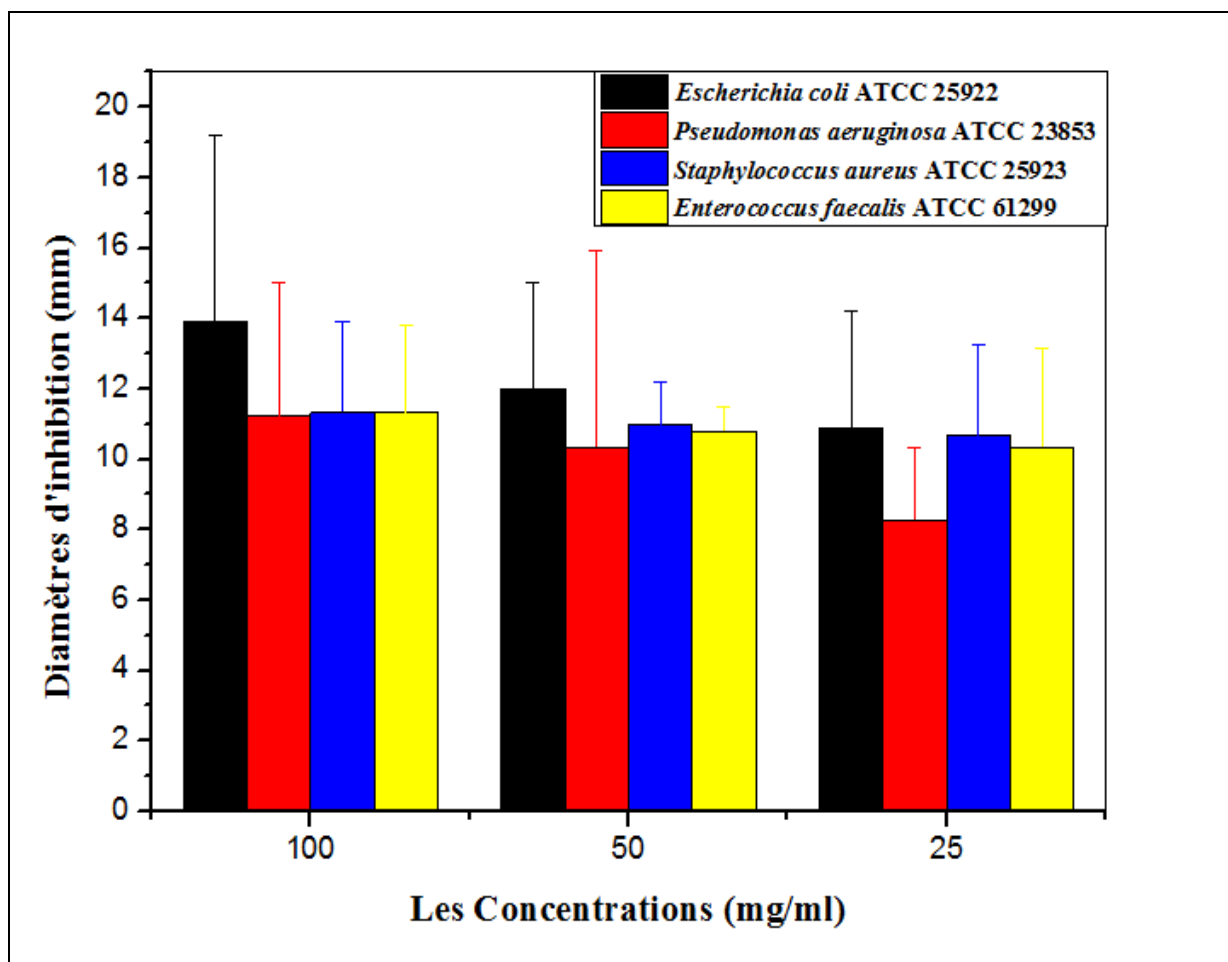


Figure 34. Histogramme représente diamètres d'inhibitions de l'activité antibactérienne de Différentes concentrations de l'extrait obtenu par extraction par Soxhlet.

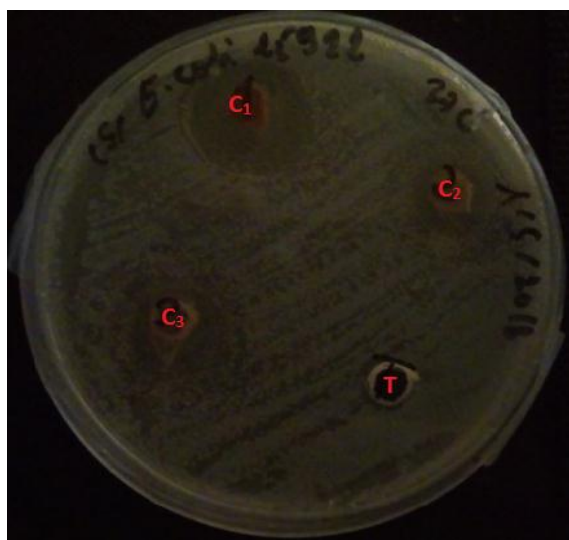


Figure 35. L'activité antibactérienne *Escherichia coli* ATCC 25922.

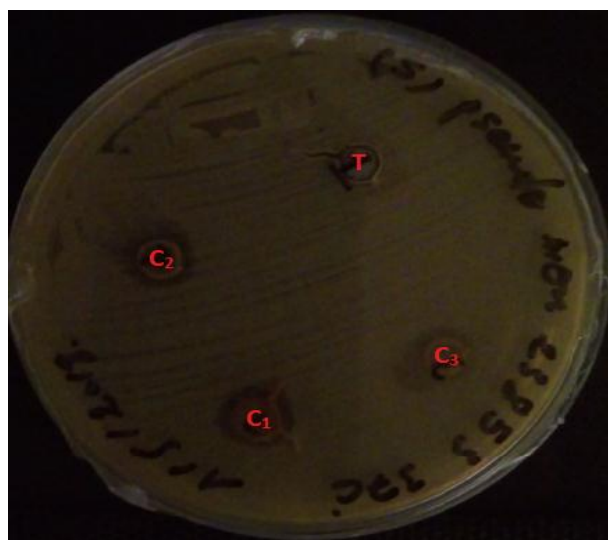


Figure 36. L'activité antibactérienne *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 23853.

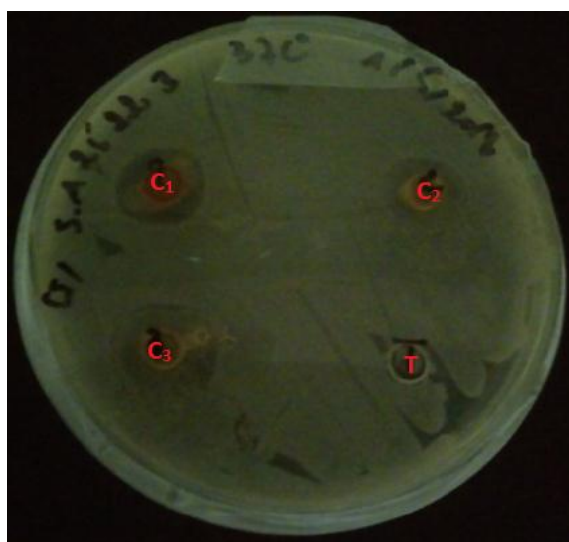


Figure37. L'activité antibactérienne *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Figure38.L'activitéantibactérienne *Enterococcus faecalis* ATCC 61299.

L'extrait obtenu par extraction par Soxhlet présente une activité antibactérienne intéressante pour toutes les concentrations 25, 50 et 100 mg/ml, dont laquelle nous avons remarqués une augmentations progressive de l'activité antibactérienne vis-à-vis des souches bactériennes testés sauf que pour la souche *Escherichia coli* ATCC 25922 on constate une forte activité antibactérienne pour toutes les concentration testés avec un diamètre d'inhibition qui peut atteindre les 14 mm pour la concentration de 200 mg/ml de l'extrait de Soxhlet.

3.2.2. Résultats de l'activité antifongique de l'extrait brut obtenu par la méthode de Soxhlet

L'activité antifongique a été évaluée *in vitro* sur trois souches fongiques (*Aspergillus niger*, *Penicillium* et *Candida albicans* ATCC 10231) par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats des différents tests présentés dans la **Figure 39**, et illustrés par les **Figure 40 à 42**.

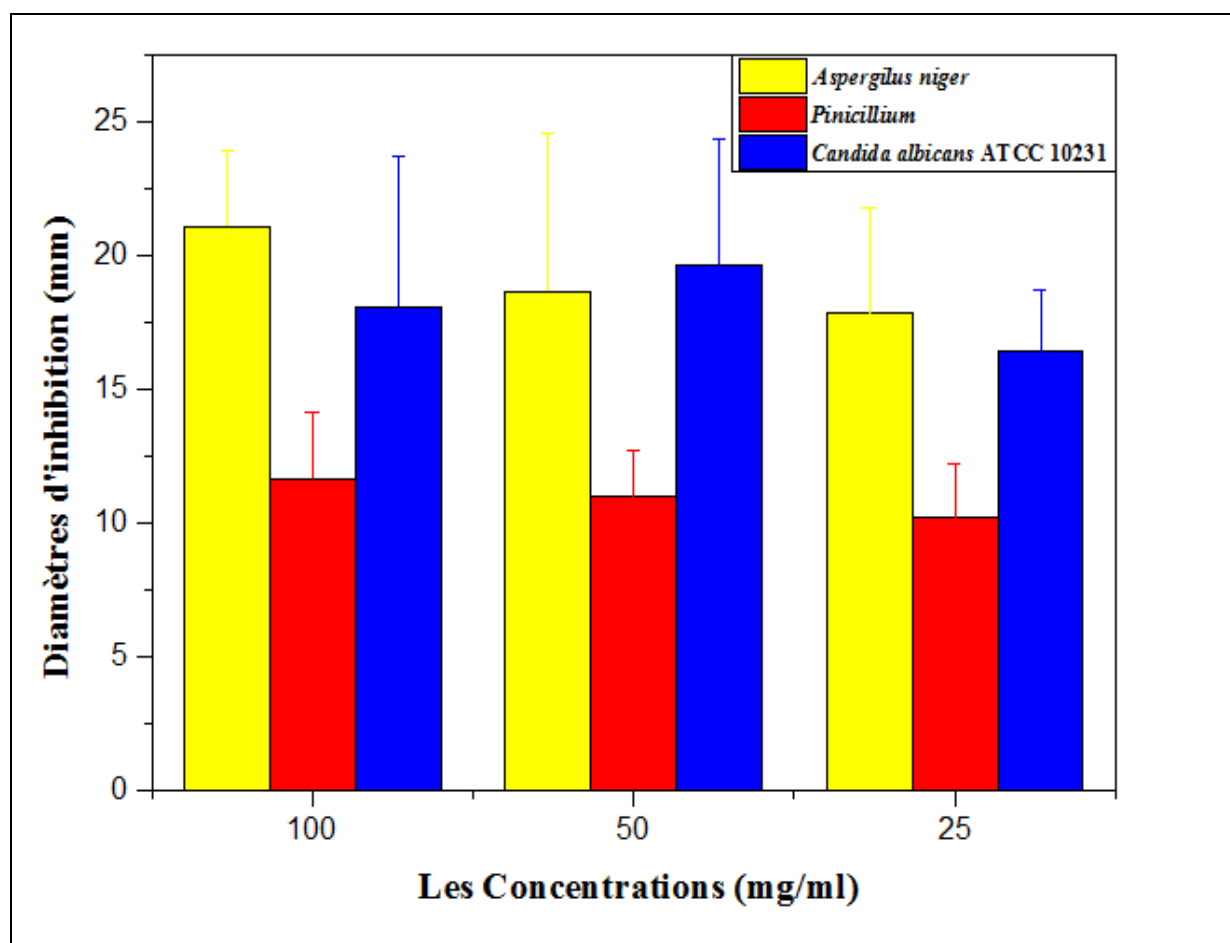


Figure 39. Histogramme représente diamètres d'inhibitions de l'activité antifongique de différentes concentrations de l'extrait obtenu par extraction par Soxhlet.



Figure 40. L'activité antifongique *Aspergillus niger*.

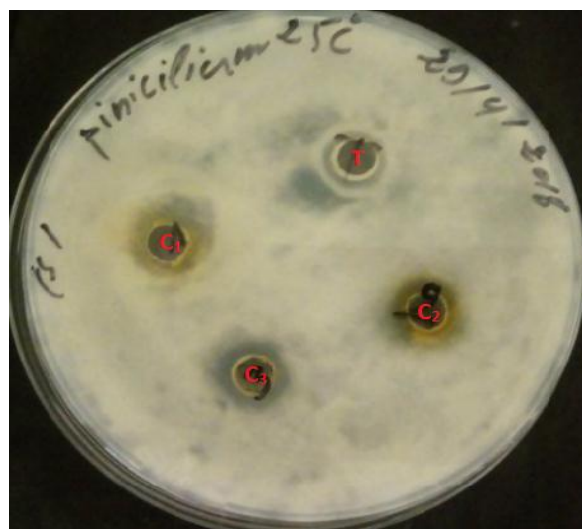


Figure 41. L'activité antifongique *Penicillium*.

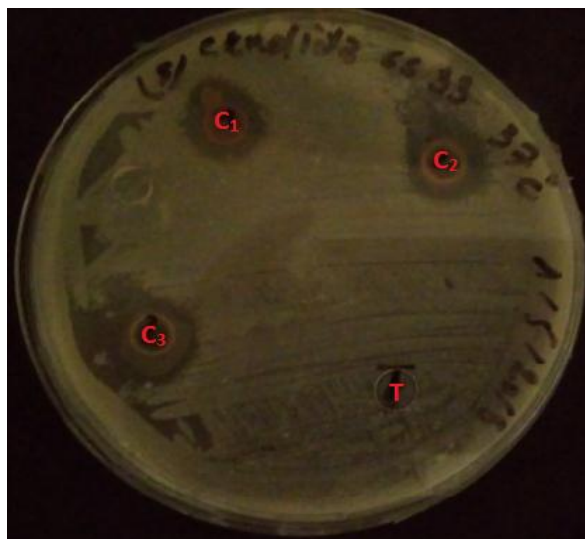


Figure 42. L'activité antifongique *Candida albicans* ATCC 10231.

L'extrait brut obtenu par extraction par Soxhlet présente une activité antifongique très intéressante pour toutes les concentrations 25, 50, 100 et 200 mg/ml, dont laquelle nous avons remarqués une augmentations progressive de l'activité antifongique vis-à-vis des souches fongique testés sauf que pour la souche *Aspergillus niger* on constate une forte activité antifongique pour toutes les concentration testés avec un diamètre d'inhibition qui peut atteindre les 22 mm pour la concentration de 200 mg/ml de l'extrait de Soxhlet.

3.3. Résultats de l'activité des antibiotiques avec cinq souches bactériennes

L'activité des antibiotiques **DO 30** (Doxycycline) **CXM 30** (Cefuroxime sodium) **SXT 25** (Sulphamethoxazole trimethoprim) **OFX 5** (ofloxaoin 5) a été évaluée *in vitro* sur cinq souches bactériennes (*Salmonella enterica* ATCC 14028, *Pseudomonas aerogenosa* ATCC 23853 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 61299, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Candida albicans* ATCC 10231), par la méthode de diffusion en milieu gélosé. Les résultats des différents tests présentés dans le **Tableau 11**, et illustrés par les **Figure 43 à 48**.

Tableau 11. Les diamètres des zones d'inhibition des antibiotiques comme témoin positive.

Les antibiotiques	DO 30	CXM 30	SXT 25	OFX 5
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 14028	17 ± 0	6 ± 0	23 ± 1	28,3 ± 5,7
<i>Pseudomonas aerogenosa</i> ATCC 23853	6 ± 0	6 ± 0	6 ± 0	20 ± 0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	31,3 ± 0,6	11 ± 0	33,7 ± 0	27,3 ± 6
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 61299	20 ± 0	6 ± 0	32,3 ± 0	22 ± 0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	15 ± 0	6 ± 0	25 ± 0	31,7 ± 0,6
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	31 ± 0	6 ± 0	34 ± 0	33 ± 0

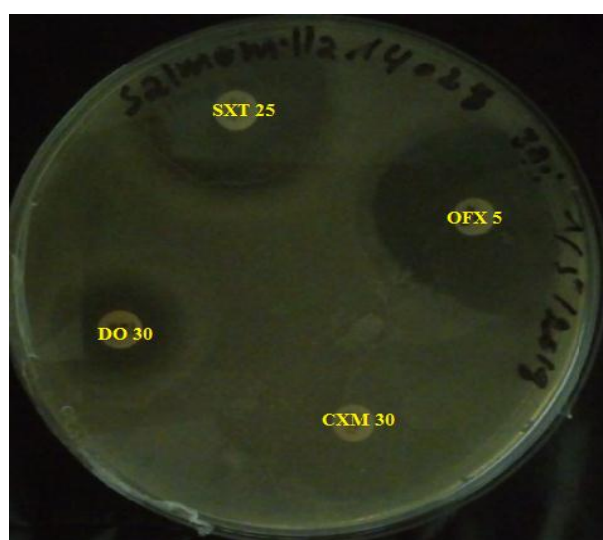


Figure 43. L'activité des antibiotiques *Salmonella enterica* ATCC 23853.

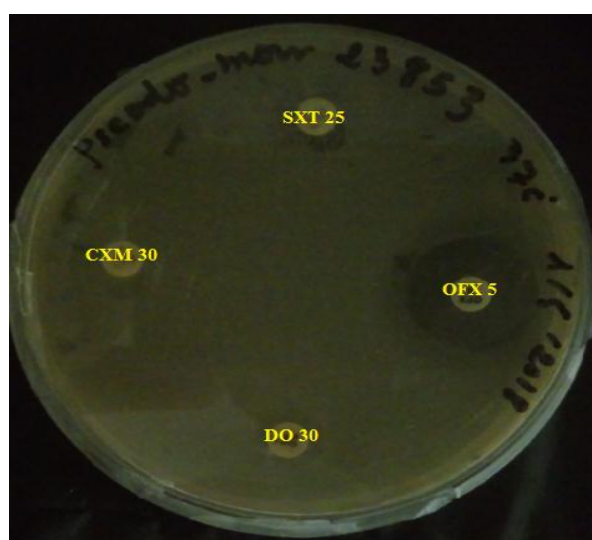


Figure 44. L'activité des antibiotiques *Pseudomonas aerogenosa* ATCC23853.

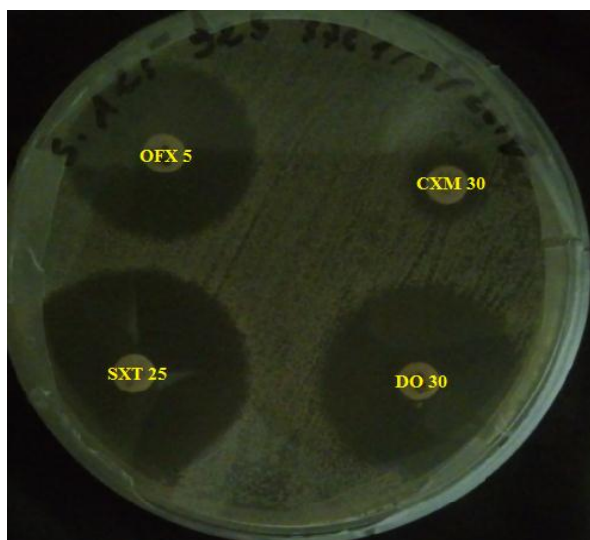


Figure 45. L'activité des antibiotiques *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

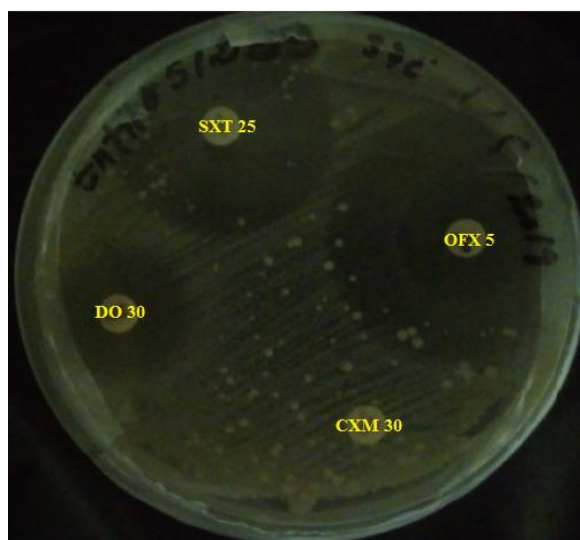


Figure 46. L'activité des antibiotiques *Enterococcus faecalis* ATCC 61299.

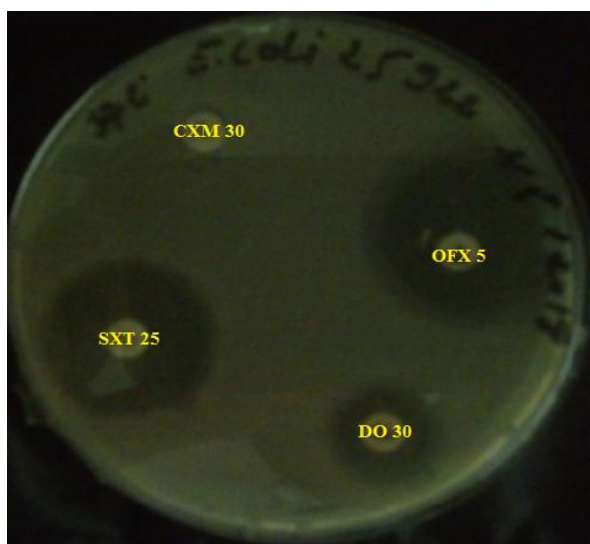


Figure 47. L'activité des antibiotiques *Escherichia coli* ATCC 25922.

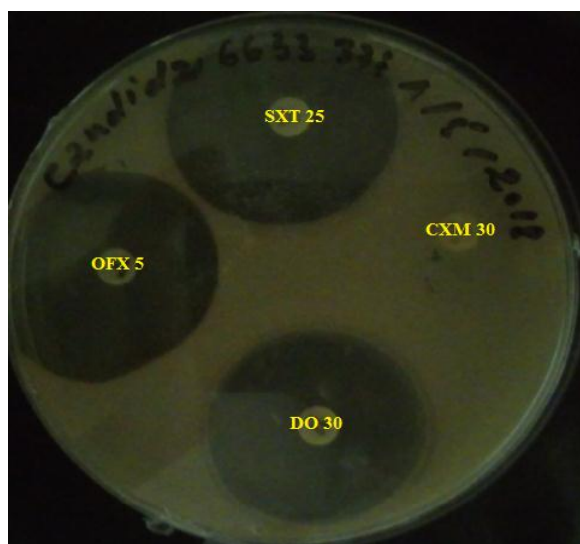


Figure 48. L'activité des antibiotiques *Candida albicans* ATCC 10231.

Les antibiotiques utilisés présentent une activité très intéressante pour toutes les bactéries sauf l'antibiotique de **CXM 30** (Cefuroxime sodium) aucune activité a été décelé, en revanche l'antibiotique de **OFX 5** (ofloxaoin 5) a montré une grande activité antimicrobienne vis-à-vis de toutes les souches bactériennes testées, nos résultats révèlent que les souches bactériennes testées sont sensibles aux antibiotiques **SXT 25** (Sulphaméthoxazole Triméthoprime) et **DO 30** (Doxycycline) et très sensible au **OFX 5** (Ofloxaoin 5), on remarque aussi que l'antibiotique de **CXM 30** (Cefuroxime sodium) ne présente aucune activité antimicrobienne contre toutes les bactéries testées sauf la souche *Staphylococcus aureus*

ATCC 25923 avec un diamètre de 11 mm, mais ça reste toujours résistante vis-à-vis de cette antibiotique.

Ces deux extraits de *T.arenaria* montrent un effet inhibiteur significatif sur la croissance de la plupart des souches microbiennes testées. Cet effet est cependant variable selon les espèces microbiennes testées et le solvant ou bien la méthode d'extraction utilisé.

En conclusion, Nous avons constaté que les extraits d'ascome de *T. arenaria* possède un effet antibactérien et antifongique sur les champignons levuriformes et sur les champignons filamenteuses; ce phénomène est plutôt rare car en général les agents antibactériens sont inactifs sur les champignons à cause de la différence de structure, d'organisation et de composition de la paroi de la cellule procaryote (bactérie) et celle eucaryote (champignon) et les levures (**Robert- Dernuet, 1995 in Mohamed- Benkada, 1999**).

L'extrait méthanolique issu de l'extraction par macération de *Terfezia arenaria* s'est révèle très efficace contre tous les souches bactériennes testées sauf *Salmonella enterica* ATCC 14028 qui s'avère résistante, en particulier contre les champignons levuriformes et filamenteuses, ces résultats sont différentes a celle obtenu par **Neggaz. (2016)** ou il a étudié cette activité sur plusieurs espèces de truffes de désert d'un même genre. Cette différence pourrait être due à la nature des régions de prospections, la constitution chimique du sol, ou également la différence en matière d'extraction (présence de chemiotypes différents), la conservation aux différences de résistance phénotypiques des souches bactériennes et des champignons testés.

L'activité antimicrobienne de l'extrait d'ascome de *T. arenaria* varié selon la nature du solvant utilisé et le microorganisme testé. L'extrait de *T. arenaria* au dichlorométhane possède un pouvoir antifongique et antibactérien plus prononcé que celui d'autre extrait à méthanol. Selon plusieurs travaux sur les extractions des composés antimicrobiennes à partir des corps fructifère de terfez, nos constaté que notre espèce *Terfezia arenaria* contient plus des substances antifongiques lorsqu'il agit de *Candida albicans* ATCC 10231, nos résultats rejoindre celle de **Neggaz. (2016)** qui ont travaillé sur quelques espèces de truffes de désert ils ont trouvé presque les mêmes résultats.

4. Analyses qualitatives et quantitatives des extraits

4.1. Analyses qualitatives des extraits

4.1.1. Chromatographie sur couche mince (CCM)

La chromatographie sur couche mince (CCM) est une méthode de séparation rapide et efficace (Kolai *et al.*, 2006). Les extraits ont été séparés en utilisant plusieurs systèmes de solvant spécifiques. Les chromatogrammes résultants ont comporté une série de spots. L'identification des composés a été basée sur (Markham, 1982) (voir matériel et méthode) par l'observation des couleurs sous lampe UV à 366 nm d'une part, et par la comparaison des RF des échantillons à ceux des étalons utilisés d'une autre part. L'ensemble des résultats de cette analyse sont consignés dans la **Figure 49**, et dans le **Tableau 12** et **13**.

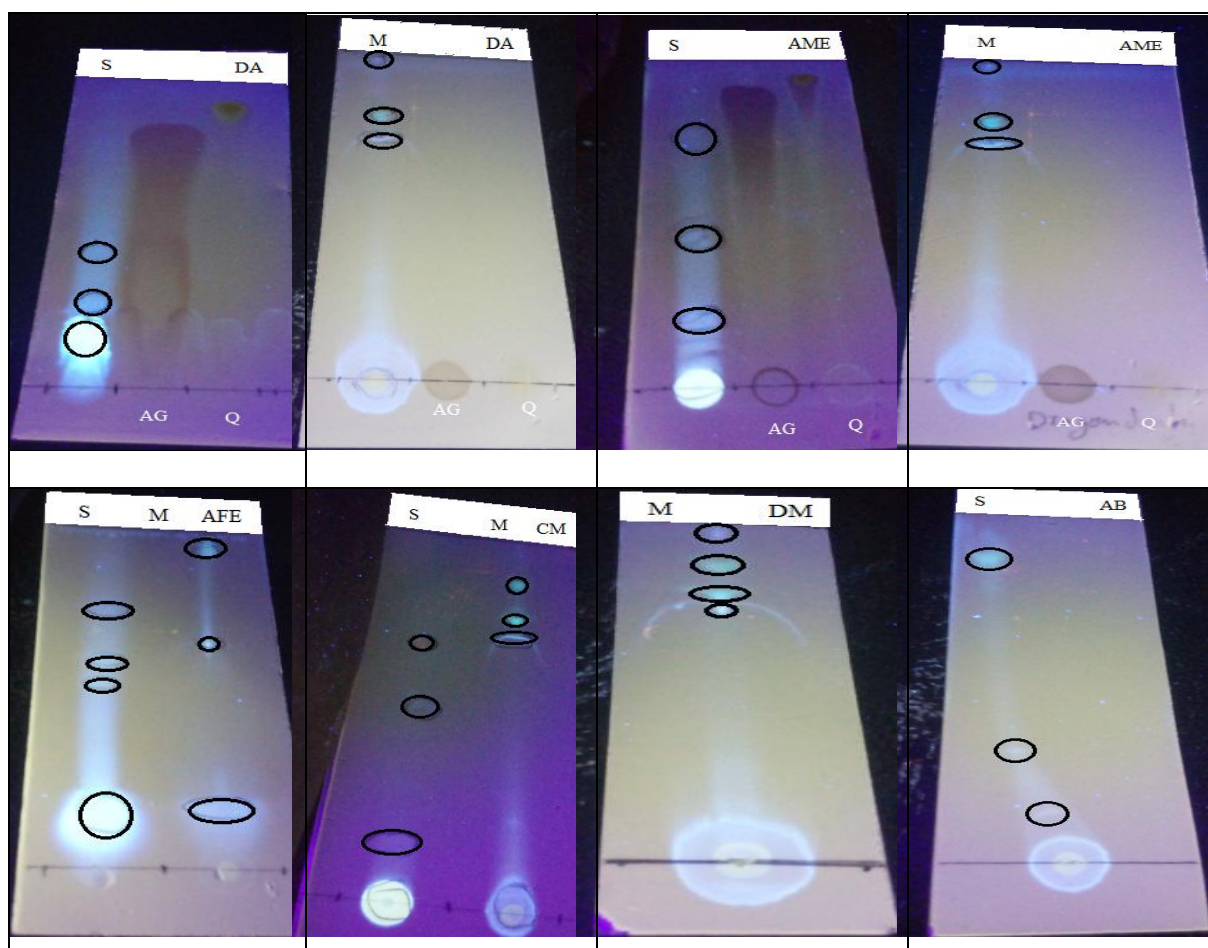


Figure 49. Résultats de la séparation des divers substances de l'extrait (M) macération et l'extrait de (S) soxhlet, avec des différents mélanges des solvants (DA) (AME) (AFE) (CM) (DM) (AB) respectivement par la technique de Chromatographie sur couche mince (CCM), et la comparaison des substances qui séparé avec (AG) et (Q).

Tableau 12. Résultats de la CCM de l'extrait de dichlorométhane par extraction par soxhlet.

Extraits	Systèmes (V/V)	Nombre de taches	RF
L'extrait de Soxhlet	CM (8/2)	Trois taches	0,18 0,53 0,63
	DM (8/2)	Mélange complexe	
	AAE (8/1/1)	Mélange complexe	
	AME (7/1,5/1,5)	Trois taches	0,16 0,37 0,51
	AE (2/8)	Mélange complexe	
	DA (9/1)	Trois taches	0,11 0,42 0,61
	AFE (8/1/1)	quatre taches	0,12 0,37 0,5 0,63
	AB (9/1)	Trois taches	0,12 0,25 0,65

Tableau 13. Résultats de la CCM de l'extrait méthanolique par extraction par macération.

Extraits	Systèmes (V/V)	Nombre de taches	RF
L'extrait de macération	CM (8/2)	Trois taches	0,78 0,83 0,91
	DM (8/2)	Quatre taches	0,43 0,62 0,75 0,9
	AAE (8/1/1)	Mélange complexe	
	AME (7/1,5/1,5)	Trois taches	0,81 0,86 0,93
	AE (2/8)	Mélange complexe	
	DA (9/1)	Trois taches	0,65 0,71 0,83
	AFE (8/1/1)	Trois taches	0,13 0,58 0,9
	AB (9/1)	Mélange complexe	

L'observation des plaques CCM sous UV à 366 nm a présenté des taches de différentes couleurs (Bleue, Bleue blanc fluorescent, verte, rouge) qui peuvent correspondre à plusieurs classes de métabolites secondaires. Les extraits analysés semblent contenir des acides phénoliques, flavonoïdes, anthocyanes) (Diallo, 2005).

La composition de l'extrait brut de macération est moins complexe vis-à-vis l'extrait au soxhlet et donc plus facile à séparer, puis que l'extrait au soxhlet plus concentré par rapport l'extrait de macération est diluant. Les systèmes de migration constitués de Acétate d'éthyl /Ether diéthylique (2/8), Acétate d'éthyl/Ac acétique /Eau (8/1/1) et Acétate d'éthyl /Ether diéthylique (8/2) et Acétate /n-Butanol (9/1) ont donné un mélange complexe et de ce fait n'ont pas permis une bonne séparation des différents constituants des deux extraits. De même,

Le système Dichlorométhane/Acétate d'éthyl (9/1), Acétate d'éthyl/Méthanol/Eau (7/1,5/1,5), Chloroforme /Méthanol (8/2), Acétate d'éthyl/Acide formique/Eau (8/1/1), n'a pas permis une très bonne séparation de l'extrait au soxhlet (mélange peu complexe) qui donne trois taches sauf le system Acétate d'éthyl/Acide formique/Eau (8/1/1) qui donne quatre taches et n'a donné que trois taches sauf le system Dichlorométhane/Méthanol (8/2) qui donne quatre taches distinctes avec l'extrait de macération.

Les deux systèmes Dichlorométhane/Méthanol (8/2) et Acétate d'éthyl/Acide formique/Eau (8/1/1) qui donné quatre taches, Dichlorométhane/Méthanol (8/2) (Bleue, Vert vif, Vert vif, Bleue) respectivement) et Acétate d'éthyl/Acide formique/Eau (8/1/1) (Bleue pâle, Bleue pâle, Bleue et Bleue blanc fluorescent respectivement) et les systèmes Acétate d'éthyl/Méthanol/Eau (7/1,5/1,5), Chloroforme /Méthanol (8/2), distinctes avec les deux extraits qui donne trois taches, le système Chloroforme /Méthanol (8/2) et Acétate d'éthyl/Méthanol/Eau (7/1,5/1,5) avec l'extrait au soxhlet donne respectivement (Bleue, Bleue pale, Rouge respectivement) (Bleue, Bleue, Bleue respectivement), et le système Chloroforme /Méthanol (8/2) , Acétate d'éthyl/Méthanol/Eau (7/1,5/1,5) avec l'extrait de macération donne respectivement (Bleue, Vert vif, Vert respectivement) (Bleue, Vert vif, Bleue respectivement) de métabolites secondaires chacun, ce qui donne une bonne lecture de la composition des deux extraits lorsque il les deux extraits contient des polyphénols et flavonoïdes sauf l'extrait de soxhlet contient aussi Anthocyanidine-3-glycoside (**Tableau 07**) et Grâce à ce système d'élution, Il est préférable d'employer des mélanges de solvants organiques appropriés avec l'eau, sachant que la majorité des polyphénols ne sont pas hydrosolubles. L'eau augmente la solubilité des flavonoïdes, et elle dépend du nombre de groupement du poids moléculaire et de la longueur de la chaine carbonée du squelette de base (**Halmi, 2015**). Le système Dichlorométhane/Acétate d'éthyl (9/1), nous avons pu mettre en évidence trois composés (trois taches de couleurs différentes) pour l'extrait au soxhlet et trois composés pour l'extrait de macération correspondant aux acides phénoliques et flavonoïdes selon la couleur (Bleu blanc fluorescent, Bleue, Bleue et Bleue, Vert vif, Bleue respectivement), Le système Acétate /n-Butanol (9/1) aucun migration avec l'extrait de macération vis-à-vis que donne trois taches avec l'extrait de dichlorométhane par l'extraction par soxhlet (Bleue pâle, Bleue pâle, Vert respectivement) nous avons mis en évidence la présence dans les extraits macération et soxhlet des flavonoïdes et polyphénols (**Figure 50**), l'extrait méthanolique par l'extraction par macération probablement riche en polyphénols de plus vis-à-vis les flavonoides, par apport l'extrait de dichlorométhane par l'extraction par

macération probablement riche en flavonoïdes de plus vis-à-vis les polyphénols ces résultats montré aussi par la méthode colorimétrique au chlorure d'aluminium pour détectés les flavonoïdes La coloration jaunâtre donnée par cette méthode est due à la formation d'un complexe entre le chlorure d'aluminium et les atomes d'oxygène présent sur les carbones 4 et 5 des flavonoïdes **Lamaison et Carnat. (1991)**. Et par la méthode colorimétrique de Folin-Ciocalteu pour détectés les polyphénols, qui est basée sur la réduction en milieu alcalin de la mixture phosphotungstique (WO_4^{2-}) phosphomolybdique (MoO_4^{2-}) de réactif de Folin par les groupement oxydables des composés phénoliques, conduisant à la formation de produits de réduction de couleur bleue **Waterman et Mole. (1994)**. Les résultats présentés dans les **Figures 50 et 51**.

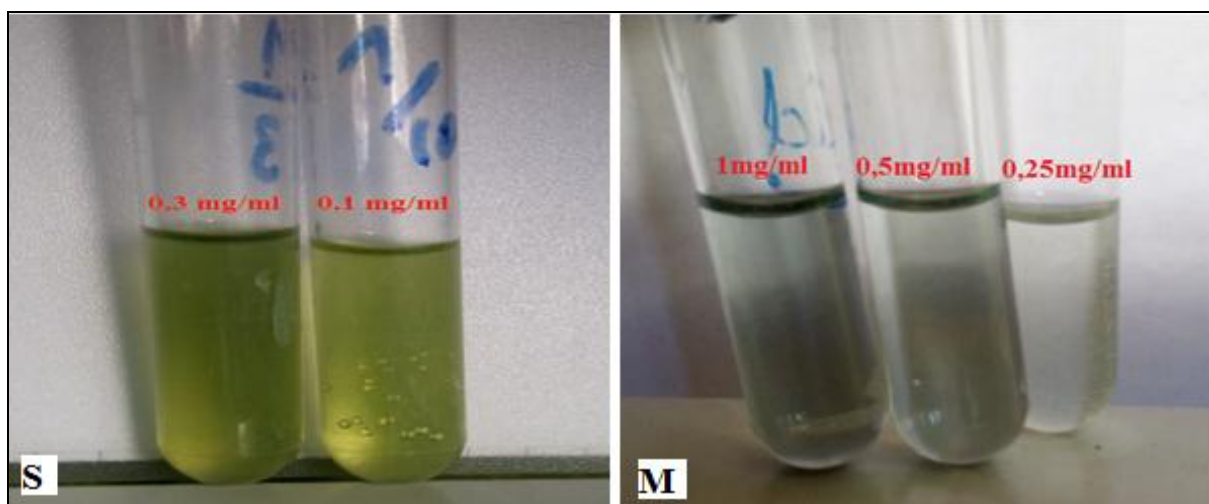


Figure 50. Dosage de polyphénol de l'extrait de (s) soxhlet et (m) macération.

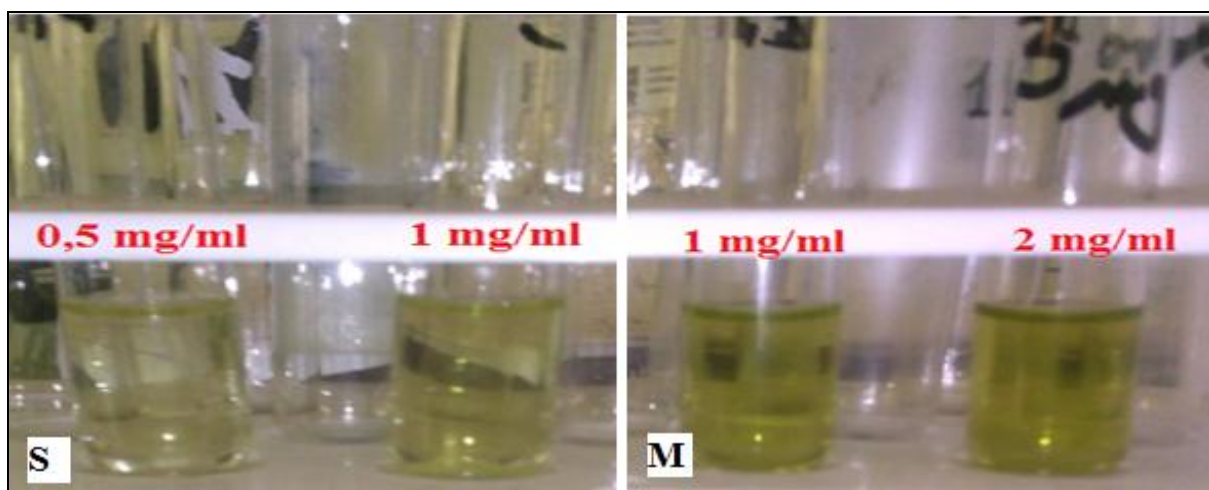


Figure 51. Dosage de flavonoïde de l'extrait de (s) soxhlet et (m) macération.

4.2. Analyses quantitatives des extraits

4.2.1. Dosage des polyphénols totaux

Les teneurs en polyphénols correspondantes ont été rapportées se microgramme d'équivalent de l'étalon utilisé et déterminées par l'équation: $y = ax+b$ (**Figure 52**).

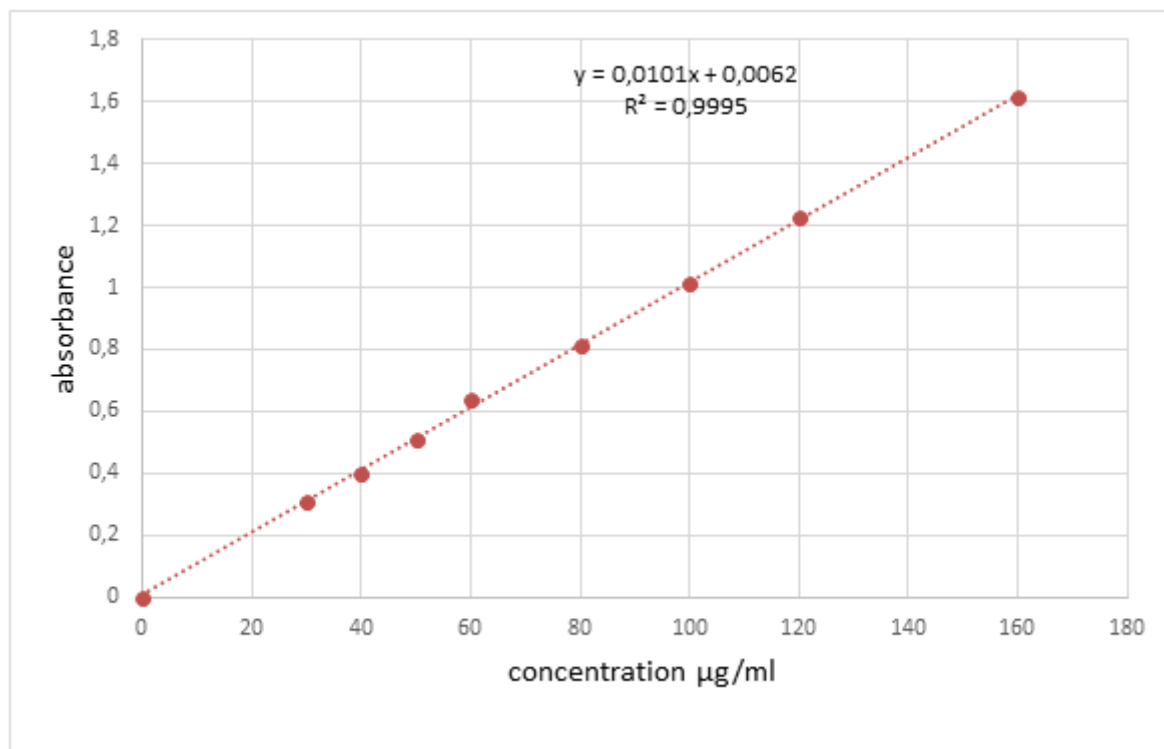


Figure 52. Courbe d'étalonnage de l'Acide Gallique (**Annexe 04**).

Pour les deux extraits méthanolique par l'extraction par macération et de la dichlorométhane par l'extraction par soxhlet de la *Terfezia arenaria*, nous avons constaté une variabilité des teneurs en polyphénols totaux (**Tableau 14**).

Tableau 14. Teneurs en phénols totaux obtenus par les deux méthodes d'extraction.

	Soxhlet		Macération		
Les concentrations (mg/ml)	0,1	0,3	0,25	0,5	1
Les absorbances	0,277	0,562	0,127	0,207	0,501
Les teneurs en polyphénols Totaux (µg/ml)	26,81	55,02	11,96	19,88	48,99

Les teneurs en polyphénols totaux ont montré que l'extrait brut méthanolique contient dans la concentration 0,5mg/ml une teneur 19,88 μg EAG/mg d'Extrait vis-à-vis l'extrait de dichlorométhane contient dans la concentration 0,1 mg/ml une teneur 26,81 μg EAG/mg, le dosage de polyphénols totaux pour les deux extraits révèle que l'extrait de dichlorométhane plus riche en polyphénols par rapport au l'extrait méthanolique, bien que la concentration de l'extrait de dichlorométhane inférieur (0,1 mg/ml) à la concentration de l'extrait méthanolique (0,5mg/ml). Cette différence peut être liée au point de vue polarité, le dichlorométhane 0,42 E° moins polarité par rapport le Méthanol 0,95 E° . Et peut-être liée à la température l'orsque que l'extraction au soxhlet s'effectuée par une température élevée.

4.2.2. Dosage des flavonoïdes totaux

Les teneurs en flavonoïdes des extraits de la terpez d'étude exprimées en μg d'Extrait sont calculées (**Figure 53**).

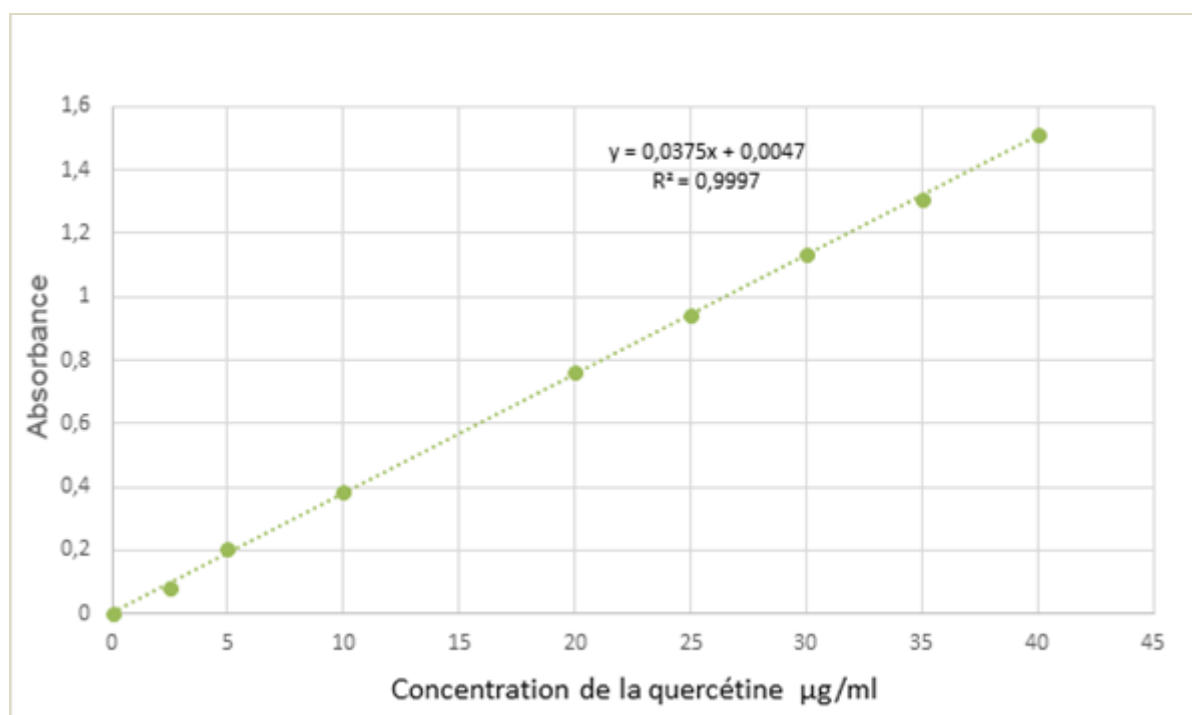


Figure 53. Courbe d'étalonnage de la quercétine (**Annexe 05**).

Le tableau Résume les résultats obtenus du dosage des flavonoïdes dans les deux extraits, l'extrait de macération et de soxhlet.

Tableau 15. Teneurs en flavonoïdes obtenus par les deux extraits.

	Soxhlet		Macération	
Les concentrations (mg/ml)	0,5	1	1	2
Les absorbances	0,123	0,218	0,372	0,831
Les teneurs en flavonoïdes Totaux (µg/ml)	3,15	5,68	9,79	22,03

Le test préliminaire a indiqué la présence de flavonoïdes dans l'extrait méthanolique et l'extrait de dichlorométhane.

Les résultats du dosage quantitatif des flavonoïdes ont révélé que l'extrait de dichlorométhane dans la concentration 01mg/ml contient 5,68 µg EQ/mg d'Extrait, par contre l'extrait méthanolique contient dans la concentration 1 mg/ml une teneur 9,79 µg EQ/mg, le dosage de flavonoïdes totaux pour les deux extraits révèle que l'extrait méthanolique est plus riche en flavonoïdes par rapport l'extrait de dichlorométhane. Cette différence des résultats est probablement due à la polarité le dichlorométhane 0,42 E° moins polarité par rapport le Méthanol 0,95 E°, et peut-être liée à la température l'orsqu'il l'extraction au soxhlet effectué par une température élevée.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Notre travail a porté sur quatre parties ; Au cours de ce travail, nous avons identifié et mettre en évidence les caractéristiques macros et microscopiques de notre échantillon de Terfez, L'identification de genre est basée sur la propriété des asques par la méthode Chloro-Iodo-Iodure ou réactif de Melzer.

L'identification des espèces fongiques a montré que les Terfez acheté sont répartis sur une seule espèce, appartenant à l'espèce: *Terfezia arenaria*. De point de vue morphologique, et pour tous les champignons acheté, a forme lobée et présentant un pied à sa base. L'aspect général est globuleux avec une apparence turbinée, le diamètre varie de 4,5 à 8 cm. L'odeur est très caractéristique puissant et agréable. Le péridium représente une enveloppe externe, peut épaisse, La couleur du péridium est de couleur brun à marron passant à noire la surface est relativement lisse et glabre, hérissée de minuscule pyramide de 3 à 4 faces, formant des petites écailles polygonales. La couleur du péridium est parmi les clés principales pour la détermination de l'espèce. La gléba correspond à correspondant au tissu fertile. C'est une chair charnue, parcourue de petites veines (sillons). L'examen microscopique de la glèbe nous a montré qu'elle est formée par un nombre important de mycéliums placés sans ordre et contenant des ascospores. Les hyphes mycéliens se ramifient et l'ensemble acquiert une forme plus ou moins annulaire. La structure est dense, formée par un nombre très élevé de veines renferment des asques. Les asques et les ascospores. En effet, pour *Terfezia arenaria* la forme est subarrondie.

Cette étude avait pour objectif de mettre en évidence la meilleure méthode d'extraction des substances bioactives dans les ascomes desséchés de l'espèce de *Terfezia arenaria*, d'évaluer les activités antimicrobiennes de différents extraits obtenus par la méthode d'extraction de soxhlet et de macération.

l'étude du pouvoir antimicrobien de *Terfezia arenaria* (Chatin) et L'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* de différents extraits d'ascomes sur cinq souches bactériennes et une souche levuriforme et deux souches fongiques a démontré que les extraits obtenus par extraction au Soxhlet ont une activité significativement forte est inhibe la plupart des microorganismes testés vis-à-vis à ceux obtenu par macération qui ont montré une faible activité antimicrobienne. Le pouvoir antimicrobien de l'extrait au dichlorométhane de *T. arenaria* au sont significativement plus important que celle obtenu par l'extrait méthanolique. L'analyse statistique de ces résultats révèle que l'activité

antimicrobienne des extraits de l'espèce de *Terfezia arenaria* du désert varie significativement selon la nature du solvant utilisé et le microorganisme testés.

L'importance de cette activité antimicrobienne des extraits de *Terfezia arenaria* du désert expliquerait l'utilisation de ces champignons en médecine traditionnelle pour traiter certaines maladies chez l'homme et chez le bétail.

L'analyse phytochimique qualitative s'est faite par les tests préliminaires et la chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits. Les résultats obtenus ont confirmés la présence de plusieurs molécules ayant un rôle cruciale dans l'activité biologique tels que: les polyphénols, les flavonoïdes. L'évaluation quantitative du contenu en polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits de la truffe par la méthode Folin- Ciocalteu et par la méthode de chlorure d'aluminium respectivement indique la présence de teneurs variables en ces composés.

En perspectives, il serait intéressant de poursuivre ce travail afin de:

- L'extraction au soxhlet par plusieurs solvants différents.
- L'extraction par lixiviation.
- L'étude du pouvoir antioxydant des extraits obtenus par les différentes méthodes d'extraction et différentes solvants.
- Rechercher d'autres activités biologiques (anti-inflammatoire, antivirale, anti-diabétique, anti-hypertensive etc.).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES ET BIBLIONET

- Awameh M.S., Alsheikh A., Ghawas S., 1979.** Mycorrhizal synthesis between *Helianthemum ledifolium*, *H. salicifolium* and four species of the genera *Terfezia* and *Tirmania* using ascospores and mycelial cultures obtained from ascospores germination. Proceedings of the 4 th North American Conference on Myc.Fort Collins, Colorado. U.S.A.
- Awameh M.S., Alsheikh A., 1979.** Characteristics and ascospore germination of white kame (*Tirmania nivea* and *T. pinoyi*). Ann. Phytopathol., 11: 223-229.
- Awameh M.S., Alsheikh A., 1980b.** Laboratory and field study of the truffle (KAME) *Terfezia* and *Tirmania*. sp and its relationship to the environments for the purpose of cultivation Part Kiisr kuwaitr, 65 P.
- Awameh M.S., Alsheikh A., 1980a.** Ascospore germination of black kame (*Terfezia boudieri*). Mycologia, 72 (1): 50-54.
- Alsheikh A.M., Trappe J.M., 1983.** Desert truffles: The genus *Tirmania*. Trans. Br. Mycol. Soc., 8 (1): 83-90.
- Alsheikh M., 1985.** Mycorrhizae of annual *Helianthemum* species formed with desert truffles. In 6th North American Conference on Mycorrhizae, Bend, Oregon (USA), 25-29 June 1984. Oregon State University. Forest Research Laboratory.
- Aviram S., Roth-Bejerano N., Kagan-Zur V., 2004.** Two ITs forms co-inhabiting a single genet of an isolate of *Terfezia boudieri* (Ascomycotina), a desert truffle. Anton. Leeuw. Int. J., 85: 169-174.
- Ammarellou A., Saremi H., Gučin F., 2007.** Evaluation of morphology, cytology and mycorrhizal relationships of desert truffles (*Terfezia boudieri*) in Iran. Pakistan Journal of Biological sciences, 10 (9): 1486-1490.
- Ammarellou A., Saremi H., 2007.** Mycorrhiza between *Kobresia bellardii* (All.) Degel and *Terfezia boudieri* Chatin. University of Zanjan, Faculty of Agriculture, Department of Plant Breeding, Zanjan – IRAN.
- Abderrazak M., Joël R., 2007.** La botanique de A à Z. Ed. Dunod. Paris. pp. 177.
- Al-Damegh M.A., 2014.** *Tirmania* (Zubaidi) and *Terfezia* (Khallasi) fungi preparation method modulates body and testicular weights and blood and testicular testosterone concentration in albino rats. Journal of American Science, 10(6): 60-66.

- Bonfante-Fasolo P., Brunel A., 1972.** Caryological features in a mycorrhizal fungus : *Tuber melanosporum* Vitt. Allionia, 18: 5-11.
- Bertault G., Raymond M., Berthomieu A., Callot G., Fernandez., 1998.** Trifling variation in truffles. Nature, 394 : p 734.
- Bratek Z., Papp L., Merkl O., Adam L., Takacs V., 1992.** Insects living in truffles. Micologia e Vegetazione Mediterranea, 7 (1): 103-107.
- Bouchareb F., 1994.** Etude écologique des terfez, cas de la région d'Ain Sefra (Wilaya de Naâma). Mém. Ing. d'état. Agron., I.N.F.S.A. Mostaganem, 81p.
- Bassah G., 1999.** Contribution à l'étude de la symbiose mycorrhiziennes entre deux espèces de Terfez : *Terfezia claveryi*, *Terfezia boudieri* avec le pin d'Alpe (*Pinus halepensis* Mill) dans la région du djelfa. Thèse Maj Institu National D'Agronomie EL-HARACH, 153p.
- Bruneton J., 1999.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 3ème Ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier, P. 207-211.
- Boumaza O., Pargnez J.C., Toutain F., Rouiller J., 2001.** Etude du micro environnement de l'ascocarpe de *Tuber mesentericum* : Premiers résultats. Bulletin de l'Académie Lorraine des Sciences, 40 (4) : 1-10.
- Bradai L., 2006.** contribution à l'étude bioécologique de la truffe blanche de désert (*Terfezia sp*) cas de la région de Oued Mya (Ouargla).Thèse de Magister. Univ .Kasdi Merbah, Ouargla.
- Bruneton J., 2009.** Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales. 4ème Ed. Paris: Tec & Doc Lavoisier, P. 207-211.
- Bradai L., Bissati S., Chenchouni H., 2013.** Etude mycologique et bioécologique de la truffe blanche du désert (*Tirmania nivea* Desf. Trappe 1971) dans la région de Oued M'ya (Ouargla, Sahara algérien). Rev Bioressources., 3 :6-14.
- Bradai L., Bissati S., Chenchouni H., Amrani K., 2015.** Effects of climate on the productivity of desert truffles beneath hyper-arid conditions. Int. J. Biometeorol., 59: 907-915.
- Chatin A.,1892.** La truffe . Lib. J. B. Baillère et fils, Paris, 372 p.
- Chatin A., 1891.** Contribution à l'histoire botanique de la tuffe: kamé de Damas (*Terfezia claveryi*). Bull. Soc. Bot. France, 38 : 332-335.
- Chevalier G. Rioussset F. et Dupre C., 1986.** Taxonomie des truffes européennes les mycorhizes : physiologie et génétique . INRA Paris ,pp 631-635.
- Callot G., 1999.** La truffe, la terre, la vie. Ed. INRA., Paris, 209 p.

- Cole G.M., Lim G.P., Yang F., Teter B., Begum A., Ma Q., Harris-White M.C., Frautschy A., 2005.** Prevention of Alzheimer's disease: omega-3 fatty acid and phenolic antioxidant interventions. *Neurobiol. Aging.*, 26: S133-S136.
- Dacosta Y., 2003.** Les phytonutriments bioactifs. Ed Yves Dacosta. Paris. 317 p.
- Diaz P., Senorans F.J., Reglero G., Ibanez E., 2002.** Truffle aroma analysis by headspace solid-phase microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (22): 6468-6472.
- Diez J., Manjon J.L., Martin F., 2002.** Molecular phylogeny of the mycorrhizal desert truffles (*Terfezia* and *Tirmania*), host specificity and edaphic tolerance. *Mycologia*, 94 (2): 247-259.
- Dundar A., Faruk Yesil O., Acay H., Okumus V., Ozdemir S., Yildiz A., 2012.** Antioxidant properties, chemical composition and nutritional value of *Terfezia boudieri* (Chatin) from Turkey. *Food Science and Technology International*, 18(4): 317-328.
- Dahham S.S., Al-Rawi S.S., Ibrahim A.H., Shah Abdul Majid A., Shah Abdul Majid A.M., 2016.** Antioxidant, anticancer, apoptosis properties and chemical composition of black truffle *Terfezia clavaryi*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, Article in press.
- Ewaze J.O., Al-Naama M.M., 1989.** Studies on nitrogen metabolism of *Terfezia* spp. and *Tirmania* spp. *New Phytologist*, 112: 419-422.
- Elicoh-Middleton J.R., Chithan K. and Theoharis C., 2000.** Effect of plant flavonoids on
- Erlund I., 2004.** Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 24, 851-874.
- Evans J., Doyle J., Dolores G., Evans., 2007.** *Escherichia coli*. Medical Microbiology, 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Fortas Z., 1990.** Etude de trois espèces de terfez : caractères culturels et cytologie du mycélium isolé et associé à *Helianthemum guttatum*. Thèse de Doctorat d'état, Univ. d'Oran Es-sénia (Algérie), INRA de Clermont-Ferrand (France), 166 p.
- Fortas Z., Chevalier G., 1992a.** Caractéristiques de la germination des ascospores de *Terfezia arenaria* (Moris) Trappe, récoltée en Algérie. *Cryptogamie, Mycol.*, 13: 21-29.
- Fortas Z., Chevalier G., 1992b.** Effet des conditions de culture sur la mycorrhization de *Helianthemum guttatum* par trois espèces de terfez des genres *Terfezia* et *Tirmania* d'Algérie. *Can. J. Bot.*, 70 : 2453-2460.
- Fahrettin G-cin., Basaran D.lger., 1997.** Yenenne antimikrobiya laktivite leriolan keme mantari (*Terfezia boudieri* Chatin) Zerinde arařtirmalar. Fatih.niversitesiFen Edb. Fak.

Biyoloji Bölümü, Beylikdüzü İstanbul, Uludağ Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, BURSA.

Fortin J.A., Plenchette C., Piché Y., 2008. Les Mycorhizes, la nouvelle révolution verte. Ed. Quae, Versailles, 129 p.

Guiraud J., Galzy P., 1980. L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Ed. L'Usine Nouvelle, Paris, 240.

Garcia-Salas P., Morales-Soto A., Segura-Carretero A. and Fernández-Gutiérrez A., 2010. Phenolic-Compound-Extraction Systems for Fruit and Vegetable Samples. *Molecules*, 15, 8813-8826.

Hussain G., Al-Ruqaie I.M., 1999. Occurrence, chemical composition and nutritional value of truffles: An overview. *Pakistan Journal of biological sciences*, 2 (2): 510-514.

Harki E., Bouya D., Dargent R., 2006. Maturation-associated alterations of the biochemical characteristics of the black truffle *Tuber melanosporum* Vitt. *Food Chemistry*, 99: 394-400.

Hartmann T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plantsecondary metabolism. *Photochemistry*, 68, 2831-2846.

Janakat S., Nassar M., 2010. Hepatoprotective Activity of Desert Truffle (*Terfezia claveryi*) in comparison with the Effect of *Nigella sativa* in the Rat. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9 (1): 52-56.

Khabar L., Najim L., Favre M., Parguey-leduc A., 1994. L'ascospores de *Terfezia leonis* Tul.(Tubérales, Discomycètes) . *Cryptogamies, Mycol.*15(3), pp 187-206.

Kimbrough J.W., 1994. Septal ultrastructure and ascomycete systematic. In *Ascomycete systematic: Problems and perspectives in the Nineties*. Ed. D.L. Hawksworth, Plenum, New York, 127-141.

Kues U., Liu Y., 2000. Fruiting body production in Basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54 : 141-152.

Khabar L., 2001. Condition à l'étude de la flore mycologique du Maroc les Truffes marocaines (Discomycètes) Extrait du *Bull. Soc.mycol .Fr.*117(3) ,pp213-229.

Khabar L., Najim L., Janex-Favre M.C., Paraguey-Leduc A., 2001. Contribution à l'étude de la flore mycologique du Maroc : Les truffes marocaines, discomycetes. *Bull. Soc. Mycol. France* 117: 213-229.

Khabar L., 2002. Etudes pluridisciplinaires des truffes du Maroc et perspectives pour l'amélioration de production des « Terfess » de la forêt de la Mamora. Thèse de Doctorat d'Etat Es-sciences, Univ. Mohamed V–Agdal, Rabat (Maroc), 167 p.

- Kovacs G.M., Bagi I., Vagvolgyi C., Kottke I., Oberwinkler F., 2002.** Studies on the root associations of the truffle *Terfezia terfezioides*. *Acta Microbiol Immunol Hung.*; 49(2-3):207-13. Department of Botany, University of Szeged, P.O. Box 657, H-6701 Szeged, Hungary.
- Khabar L., Laruelle F., Fontaine J., Najim L., Sancholle M., Durand R., 2004.** Acides gras et stérols de quelques champignons hypogés du Maroc. Premier symposium sur les champignons hypogés du bassin méditerranéen, Rabat (Maroc), p 39.
- Khabar L., Najim L., 2004.** Truffes du désert du Maroc : état des recherches. Premier symposium sur les champignons hypogés du bassin méditerranéen, Rabat (Maroc), p 38.
- Kovacs G.M., Jakucs E., Bagi I., 2007.** Identification of host plants and description of sclerotia of the truffle *Mattirolomyces terfezioides*. *Mycol. Progress*, 6: 19-26.
- Kagan-Zur V., Zaretsky M., Sitrit Y., Roth-Bejerano N., 2008.** *Hypogeous pezizaceae* : physiology and molecular genetics. Ed. A. Varma, Mycorrhiza, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 161-183.
- Khojasteh S.M.B., Amiri L., Sheikhzadeh F., 2013.** Effect of the alcoholic extract of *Terfezia boudierion* reproductive hormones in male rats. *International Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 3 (2): 517-522.
- Lamaison J. L., Petitjean-Freyet C., & Carnat A., 1991.** Lamiacees medicinales a proprietes antioxydantes, sources potentielles d'acide-rosmarinique. *Pharmaceutica acta helvetiae*, 66(7), 185-188.
- Laverdière M., 2006.** Progressive loss of echinocandin activity following prolonged use for treatment of *Candida albicans* oesophagitis. *J Antimicro. Chemother.*, 57 : 705-708.
- mammalian cells: implications for inflammation, heart diseases and cancer. *Pharmacology and Experimental therapeutics*, 4(52), 673-751.
- Malençon G., 1973.** Champignons Hypogés du Nord de l'Afrique. Ascomycètes. *Persoonia*; (7): 261-288.
- Meyer K.C., Zimmerman J., 1993.** Neutrophil mediators, *Pseudomonas* , and pulmonary dysfunction in cystic fibrosis. *J. Lab. Clin. Med.*, 121: 654-661.
- Montanini B., Betti M., Marquez A.J., Balestrini R., Bonfante P., Ottonello S., 2003.** Distinctive properties and expression profiles of glutamine synthetase from a plant symbiotic fungus. *Biochem. J.*, 373: 357-368.
- Murat C., Mello A., Abbà S., Vizzini A., Bonfante P., 2008.** Edible mycorrhizal fungi: Identification, life cycle and morphogenesis. Ed. A. Varma, Mycorrhiza, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 707-732.

- Morte A., Zamora M., Gutiérrez A., Honrubia M., 2009.** Desert Truffle Cultivation in Semiarid Mediterranean Areas in: Mycorrhizas Functional Processes and Ecological Impact Chapter 15. Eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 221-234.
- Mekawey A.A.I., 2015.** *Terfezia boudieri* as sources of antitumor and antiviral agent. World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences, 4 (5): 294-315.
- Neggaz S., 2010.** Analyses chromatographiques et spectroscopiques des composés antimicrobiens d'une espèce de terfez : *Tirmania pinoyi* (Maire). Mémoire de Magister, Univ. Oran, Es-sénia, 107 p.
- Neggaz S., 2016.** Etude des activités antimicrobiennes et antioxydantes des truffes du désert d'Algérie et criblage chimique de leurs substances bioactives. Thèse pour l'obtention du Doctorat en science, spécialité : Biotechnologie Microbienne. Oran, Université Ahmed ben Bella, 193 p.
- Percudani R., Trevisi A., Zambonelli A., Ottonello S., 1999.** Molecular phylogeny of truffles (*Pezizales: Terfeziaceae, Tuberaceae*) derived from nuclear rDNA sequence analysis. Molecular phylogenetics and evolution, 13 (1): 169-180.
- Pargney j.C., 2004.** Structure des peridiums des ascocarpes des différents Tuber. Actes du 1^{er} Symposium sur les Champignons Hypogés du Bassin Méditerranéen, 6-8 avril, Rabat, Maroc, 177-191.
- Paolocci F., Rubini A., Riccioni C., Arcioni S., 2006.** Reevaluation of the life cycle of *Tuber magnatum*. Appl. Environ. Microbiol., 72 : 2390-2393.
- Rougieux R., 1963.** Actions antibiotiques et stimulantes de la truffe du désert (*T. boudieri* Chatin). Ann. Inst. Pasteur. Paris, 105 : 315-318.
- Riousset G., Riousset L., Chevalier G., Bradet M.C., 2001.** Truffes d'Europe et de Chine. Ed. INRA, Paris, 179 p.
- Riboli E., Norat T., 2003.** Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. Am. J. Clin. Nutr., 78: 559-569.
- Ricard J.M., 2003.** La Truffe Guide technique de trufficulture. Ctifl.33, 48, 49, 50.
- Roth-Bejerano N., LiY F., Kagan-Zur V., 2004a.** Homokaryotic and heterokaryotic hyphae in *Terfezia*. Antonie Van Leeuwenhoek, 85: 165-168.
- Ryan K.J., Ray C.G., 2004.** Sherris Medical Microbiology, 4th ed., McGraw Hill, 294p.
- Sadat G., 1994.** Contribution à l'étude de l'association symbiotiques entre le genre *Terfezia* sp. et les espèces *l'Helianthemum*, *Pinus halepensis* et *Pinus canariensis*, Men .Ing .Agr. I.N.A .EL-HARACH .Alger ,57 p.

- Singleton P., 1999.** Bactériologie, 4ème Ed. Dunod, Paris, p 391.
- Samson R.A., Houbraken J., Summerbell R.C., Flannigan B., Miller J.D., 2001.** Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments. In: Microorganisms in Home and Indoor Work Environments. New York: 287-292.
- Slama A., Neffati M., Fortas Z., Khabar L., Boudabous A., 2006.** Etude taxinomique de quelques Ascomycota hypogés (*Terfeziaceae*) de la Tunisie Méridionale. Bull. Soc. Mycol. Fr., 122 (2-3): 187-195.
- Shavit E., 2008.** Medicinal mushrooms: Truffles roasting in the evening fires, Pages from the History of desert truffles. Truffles, 1 (3): 18-23.
- Shavit E., Shavit E., 2014.** The Medicinal Value of Desert Truffles. In Kagan-Zur V., Roth-Bejerano N., Sitrit Y., Morte A., (eds), Desert Truffles Phylogeny, Physiology, Distribution and Domestication, Soil Biology, 38: 323-340, Springer, Berlin.
- Saddiq A.A., Yousef J.M., Mohamed A.M., Danial E.N., 2015.** In vitro and in vivo safety evaluation of *Terfezia claveryi* fruiting bodies extract. Romanian Biotechnological Letters, 20 (5):10885-10892.
- Trappe J. M., 1971.** A synopsis of the *Carbomycetaceae* and *Terfeziaceae* (*Tubérales*). Trans. Br. Mycol. Soc., 57: 85-92.
- Trappe J. M., 1979.** The orders, families and genera of hypogeous ascomycotina (Truffles and their relatives) Mycotaxon , 9 :297-340.
- Taylor F.W, Thamage D.M., Baker N., Roth-Bejerano N., Kagan-ZurV., 1995.** Notes on the Kalahari desert truffle, *Terfezia pfeilii*. Mycological Research, 99 (7): 874-878.
- Tadja A., 1996.** Etude écologique de deux espèces de *Terfezia* du sud Oued Algérie Essai de leur mycorhization sur trois espèces céréalières .Thèse magistère .I.N.A .El-Harrach .Alger ,57p.
- Trappe J.M., Claridge A.W., Arora D., Adriaan Smit W., 2008.** Desert truffles of the African Kalahari: Ecology, Ethnomycology and taxonomy. Economic Botany, 62 (3): 521-529.
- Volpato G., Rossi D., Dentoni D., 2013.** A Reward for Patience and Suffering: Ethnomycology and Commodification of Desert Truffles among Sahrawi Refugees and Nomads of Western Sahara. Economic Botany, 67 (2):147–160.
- Waterman Peter. G., 1994.** Colobine food selection and plant chemistry, 251.
- Winkel-Shirley B., 2001.** Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*, 126 (2), 485-493.

Wasser S. P., 2002. Medicinal mushrooms, as a source of and immunomodulating polysaccharides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60: 256-274.

Wasser S. P., 2010. Medicinal mushroom science: history, current status, future trends, and unsolved problems. *Int. J. Med. Mushrooms.*, 12: 1-16.

Zitouni F.E.H., 2010. Etude des associations mycorrhiziennes entre quatre espèces de terfez et diverses plantes cistacées et ligneuses en conditions contrôlées. Mémoire de magister, Univ. D'Oran1 Ahmed Ben Bella, 264 p.

Zitouni-Haouar F.E.H., Fortas Z., Chevalier G., 2014. Morphological characterization of mycorrhizae formed between three *Terfezia* species (desert truffles) and several Cistaceae and Aleppo pine. *Mycorrhiza.*, 24: 397-403.

Zitouni-Haouar F.E.H., Alvarado P., Sbissi I., Boudabous A., Fortas Z., Moreno G., Manjon J.L., Gtari M., 2015. Contrasted Genetic Diversity, Relevance of Climate and Host Plants, and Comments on the Taxonomic Problems of the Genus *Picoa* (*Pyronemataceae*, *Pezizales*). *Plos ONE*. DOI: 10.1371/journal.Plosone.0138513.

أحمد بن علي حجر , العسقلاني فتح الباري شرح البخاري دار المعرفة بيروت-لبنان 852 -883.

BIBLIONET

Anonyme 01 : <http://mycota-crcc.mnhn.fr>.

Anonyme 02 : <https://fr.wikipedia.org/wiki/M%C3%A9thanol>.

Anonyme 03 : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Dichlorom%C3%A9thane>.

Anonyme 04 : <https://fr.wikipedia.org/wiki/Dim%C3%A9thylsulfoxyde>.

ANNEXES

Annexe 01. Tableau de Trappe (Trappe, 1979).

Caractéristiques Genres et espèces	Péridium	Gléba	asque	ascospore	Plante-hôte	Habitat
Terfezia arenaria (Trappe, 1971). T .Leonis Tul.	Couleur mate passant à brun. Rouge avec l'âge. Epais	Couleur blanchâtre puis marbrée rose Ocré. lobée ou divisée en petites masses. Présence de poches jaunes à marron sombre espacées de veines stériles.	Subglobul eux à Ellipsoïde Grand contenant de 5à8spores. Dimensio- n : 51à56 x62à65µm	Sphérique non alvéolée avec papilles. Grosses obtusés, tronquées. Pourtour avec des dents d'engrenage. Dimension : 22à26µm	Tuberaria guttata. Helianthemum guttatum, Pinus	Afrique du Nord : Algérie, Maroc, Tunisie, Libye. Dans les forêts de pins et de cèdres en Espagne. .Amérique du Nord, Asie. Italie.

Annexe 02. Les milieux des cultures

➤ Composition de la gélose nutritive (Guiraud et Galzy, 1980).

-Bouillon nutritif.....	1000mL
- pH	7.0
-Agar-agar.....	20g

➤ Composition du bouillon nutritif (Guiraud et Galzy, 1980).

-Peptone.....	5g
-Extrait de viande.....	3g
-Na Cl.....	5g
-Eau distillée.....	1000 mL
-pH.....	7.0

➤ Milieu Mueller-Hinton (**Guiraud et Galzy, 1980**).

- Extrait de viande ou de foie.....	2g
- Hydrolysate acide de caséine.....	17.5g
- Amidon.....	1.5g
- Eau distillée.....	1000mL
- pH	7.4
- Agar-agar.....	20g

➤ Composition du milieu PDA gélosé (Potato Dextrose Agar) (**Guiraud et Galzy, 1980**).

- Extrait de pomme de terre.....	1000mL
- Glucose.....	20g
- pH	5.6 ± 0.2
- Agar-agar.....	20g

L'extrait de pomme de terre est préparé comme suit : 200g de pomme de terre sont lavés, découpés et portés à l'ébullition pendant une heure dans 1000 mL d'eau distillée. Le filtrat récupéré est complété à 1000 mL avec de l'eau distillée. Après addition du glucose et ajustement du pH, l'Agar-agar (20g) est ajouté et dissout à chaud.

N.B : tous les milieux de culture sont autoclavés à 120°C pendant 30 minutes.

Annexe 03. Les solvants organiques

➤ **Méthanol.**

Le méthanol est un composé chimique de formule : CH₃OH. C'est le plus simple des alcools. C'est un liquide léger, volatil, incolore, inflammable, toxique avec une odeur caractéristique, plus douce et sucrée que celle de l'éthanol. (**Anonyme 02**).

Masse molaire : 32,04 g/mol

Formule : CH₃OH

Masse volumique : 792 kg/m³

Point d'ébullition : 64,7 °C

Point de fusion : -97,6 °C

Classification : Alcool

➤ **Dichlorométhane.**

Le dichlorométhane ou chlorure de méthylène, est un composé chimique se présentant à température ambiante comme un liquide incolore et volatil émettant une odeur douceâtre relativement forte pouvant mettre certaines personnes mal à l'aise. (**Anonyme 03**).

Masse volumique : 1,33 g/cm³

Formule : CH₂Cl₂

Point d'ébullition : 39,6 °C

Masse molaire : 84,93 g/mol

Point de fusion : -96,7 °C

Nom IUPAC : Dichlorométhane

Diméthylsulfoxyde.

Le diméthylsulfoxyde noté aussi DMSO est un solvant polaire organique, aprotique, de formule brute C₂H₆OS. (**Anonyme 04**).

Solubilité : 1 000 g·l⁻¹ à 20 °C

Indice de réfraction : 1,477

Limites d'explosivité dans l'air : 1,8- Vol. %

Point d'éclair : 88 °C

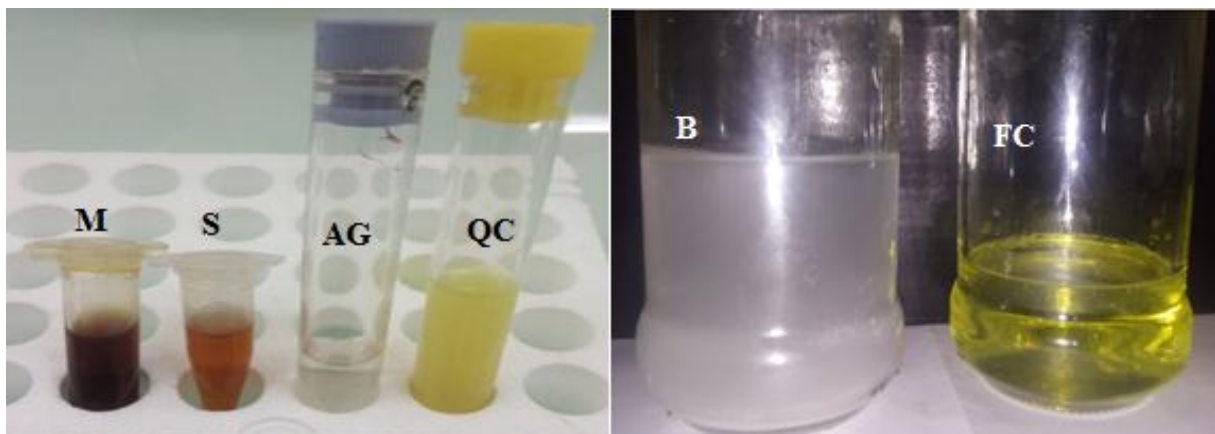
Formule brute : C₂H₆OS;

Moment dipolaire : 4,06 D

Annexe 04. Les Réactifs et extraits utilisés dans le dosage des polyphénols et flavonoïdes



Annexe 04. (B) Bicarbonate de sodium, (AG) acide gallique, (QC) quercétine et (CA) chlorure d'aluminium en poudre (Sidali et zinelabidin 2018).

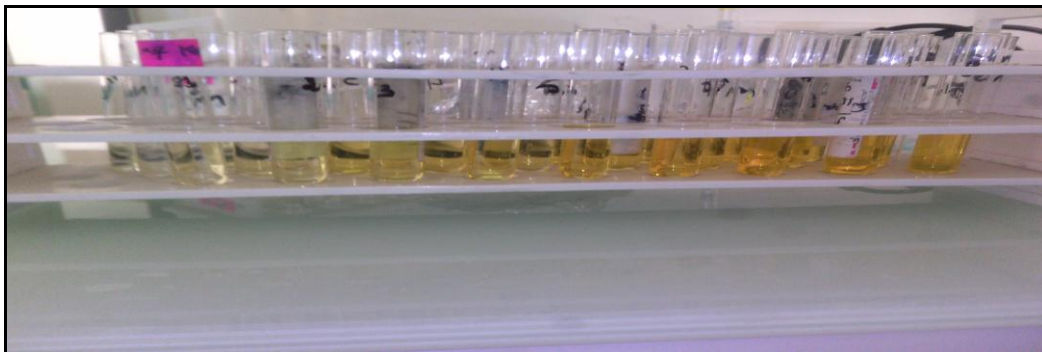


Annexe 04. (M) l'extrait méthanolique avec le méthanol, (S) l'extrait de dichlorométhane au soxhlet avec le DMSO, (AG) l'acide gallique avec l'eau distillé, (QC) quercétine avec l'eau distillé (B) Bicarbonate de sodium avec l'eau distillé et (FC) Folin-Ciocalteu (Sidali et zinelabidin 2018).

Annexe 05. Dosage des polyphénols et flavonoïdes.



Annexe 05. Différents Concentration de l'acide gallique avec le réactif de Folin-Ciocalteu (Sidali et zinelabidin 2018).



Annexe 05. Différents Concentration de la quercétine avec le réactif de Chlorure d'aluminium (Sidali et zinelabidin 2018).

Résumé

Notre thème de recherche porte sur l'identification et la caractérisation macro et microscopique de la truffe du désert, comiquement appelée les (Terfez), L'objectif de ce travail est de mettre en évidence la meilleure méthode d'extraction des substances bioactives dans des ascomes desséchés de l'espèce de *Terfezia arenaria*, d'évaluer les activités antimicrobiennes de différents extraits obtenus. L'évaluation de l'activité antimicrobienne *in vitro* de différents extraits d'ascomes sur cinq souches bactériennes et une souche levuriforme et deux souches fongiques a montré que la plupart des extraits obtenus par extraction au Soxhlet ont un pouvoir antimicrobien fort vis à vis des bactéries à Gram positif, à Gram négatif et *Candida albicans*, par rapport à ce obtenu par macération ont un pouvoir antimicrobien faible. L'analyse phytochimique qualitative réalisée par les tests préliminaires et la chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits a confirmé la présence de plusieurs molécules tels que: Les polyphénols, les flavonoïdes. L'évaluation quantitative du contenu en polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits de la plante indique la présence de teneurs variables en ces composés. L'évaluation quantitative du contenu en polyphénols totaux et des flavonoïdes dans les extraits de la *Terfezia arenaria* indique la présence de teneurs variables en ces composés.

Mots clés: *Terfezia arenaria*, extraction au Soxhlet et macération, l'activité antimicrobienne, chromatographie, polyphénols flavonoïdes.

Abstract

Our research project focuses on the identification and macro and microscopic characterization of desert truffle, known as the (Terfez). The objective of this work is to high light the best method of extraction of bioactive substances in dried aspects of the species *Terfezia arenaria*, and to evaluate the antimicrobial activities of different extracts obtained. the *in vitro* evaluation antimicrobial activity of different ascomes extracts on five bacterial strains and one yeast strain and two fungal strains showed that most extracts obtained by Soxhlet extraction have a strong antimicrobial effect against gram-positive bacteria. Gram-negative and *Candida albicans*, by means of maceration, have low antimicrobial potency. The qualitative phytochemical analysis performed by the preliminary tests and thin layer chromatography (CCM) of the extracts confirmed the presence of several molecules such as: Polyphenols, flavonoids. Quantitative evaluation of the content of total polyphenols and des flavonoids in extracts of the plant indicates the presence of variable contents in these compounds. quantitative evaluation of the content of total polyphenols and flavonoids in *Terfezia arenaria* extracts indicates the presence of different concentration of these compounds.

Key words: *Terfezia arenaria*, extraction with Soxhlet and macération, antimicrobial activity, chromatography, flavonoid polyphenols.

الملخص

تركز موضوع بحثنا على تحديد نوع الكمأة الصحراوية، المعروف باسم ترفافس، ودراسة خصائصها المايكروسكوبية والميكروسكوبية، ويهدف عملنا أيضا على إيجاد أحسن الطرق لاستخلاص المواد النشطة في الكمأة المجففة لنوع *Terfezia arenaria* الذي تم التعرف عليه في المخبر لمستخلصات مختلفة تم الحصول عليها من خلال طريقة الاستخلاص Soxhlet و macération حيث كان مردود مستخلص هاته الأخيرة أكبر. وأظهر تقييم المستخلصات في المختبر نشاط مضاد للميكروبات على خمسة سلالات بكتيرية و ثلاث سلالات فطرية و كان المستخلص الذي حصلنا عليه عن طريق الاستخلاص في Soxhlet له تأثير مضاد للميكروبات قوي ضد البكتيريا gram+، gram- وكذلك له تأثير ضد الفطريات وخاصة ضد فطر الخميرة *Candida albicans*، بالمقابل كان للمستخلص الذي حصلنا عليه عن طريق الاستخلاص ب macération له نشاط مضاد ضعيف على أغلب السلالات البكتيرية والسلالات الفطرية. وقمنا أيضا في بحثنا هذا ب التحليل الكيميائي النوعي الذي أجريناه عن طريق الكروماتوغرافيا (CCM) والكمي بواسطة التحليل الكمي لعائلة polyphénols لمستخلصات macération و Soxhlet المستخلصة من *Terfezia arenaria* وقد أظهرت النتائج وجود مركبات مختلفة من polyphénols و flavanoides في المستخلصين، وأظهرت النتائج أيضا أن مستخلص macération يحتوي على نسبة من flavanoides أعلى من polyphénols، على عكس مستخلص Soxhlet.

الكلمات المفتاحية: الاستخلاص في Soxhlet، الاستخلاص ب macération، نشاط مضاد للميكروبات، chromatographie، polyphénols، flavonoïdes، *Terfezia arenaria*، الكروماتوغرافيا (CCM).

