

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABOU- BEKR BELKAID –TLEMCEM



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

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DES PRODUITS NATURELS (LAPRONA)

LABORATOIRE DE VALORISATION DES RESSOURCES VEGETALES
ET SECURITE SANITAIRE DANS LES ZONES SEMI-ARIDES (VRVSA)

THESE EN VU DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTORAT Es-SCIENCES
Option : SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS

Présentée par M^r : AMROUCHE ABDEL ILLAH

Thème :

**ETUDE IN VITRO DE L'EFFET ANTIFONGIQUE DES
HUILES EXTRAITES DE PLANTES MEDICINALES ET
LEURS EFFETS CHEZ DES RATS WISTAR CONTAMINES
PAR LES MYCOTOXINES**

Soutenu le :

devant le jury

M ^{me} . ATIK BEKARA FOUZIA	Professeur	Université /Tlemcen	Présidente
M ^r . CHABANE SARI.DAOUDI	Professeur	Université /Tlemcen	Directeur de thèse
M ^r . MOUSSAOUI ABDALLAH	Professeur	Université /Bechar	Co-directeur de thèse
M ^{me} MERZOUK HAFEDA	Professeur	Université /Tlemcen	Examinatrice
M ^{me} BOUCHERIT OTHMANI ZAHIA	Professeur	Université /Tlemcen	Examinatrice
M ^r . MEDDAH BOUMEDIENNE	Professeur	Université /Mascara	Examineur
M ^r . LAHOUAL MESBAH	Professeur	Université /Jijel	Examineur

Année Universitaire 2012/2013

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR & DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABOU- BEKR BELKAID –TLEMCCEN



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

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

LABORATOIRE DES PRODUITS NATURELS (LAPRONA)

LABORATOIRE DE VALORISATION DES RESSOURCES VEGETALES
ET SECURITE SANITAIRE DANS LES ZONES SEMI-ARIDES (VRVSA)

THESE EN VU DE L'OBTENTION
DU DIPLOME DE DOCTORAT Es-SCIENCES
Option : SECURITE SANITAIRE DES ALIMENTS

Présentée par M^r : AMROUCHE ABDEL ILLAH

Thème :

**ETUDE IN VITRO DE L'EFFET ANTIFONGIQUE DES
HUILES EXTRAITES DE PLANTES MEDICINALES ET
LEURS EFFETS CHEZ DES RATS WISTAR CONTAMINES
PAR LES MYCOTOXINES**

Soutenu le : devant le jury

M ^{me} . ATIK BEKARA FOUZIA	Professeur	Université /Tlemcen	Présidente
M ^r . CHABANE SARI.DAOUDI	Professeur	Université /Tlemcen	Directeur de thèse
M ^r . MOUSSAOUI ABDALLAH	Professeur	Université /Bechar	Co-directeur de thèse
M ^{me} MERZOUK HAFEDA	Professeur	Université /Tlemcen	Examinatrice
M ^{me} BOUCHERIT OTHMANI ZAHIA	Professeur	Université /Tlemcen	Examinatrice
M ^r . MEDDAH BOUMEDIENNE	Professeur	Université /Mascara	Examineur
M ^r . LAHOUAL MESBAH	Professeur	Université /Jijel	Examineur

Année Universitaire 2012/2013

Publications

LISTE DES PUBLICATIONS ET DES COMMUNICATIONS

Ce travail a fait l'objet publications et de participation à des séminaires internationaux et à des journées nationales.

PUBLICATIONS

1. **A.Amrouche**, H. Benmehdi, A. Moussaoui, K. Mebarki, A Chaoufi, A. Saneba, A. Lazouni .H and D. Chabane Sari. **Evaluation of antifungal activity of some oils from Algerian medicinal plants against *Aspergillus flavus* strain produced aflatoxins.** *Journal of Applied Pharmaceutical Science* 01 (08); 2011: 48-53.
2. **A.Amrouche**, H. Benmehdi, S. Bedjaoui, H. Dalile, A. Khelif, K. Fellah, I. Boublenza, A. Lazouni .H, A. Moussaoui and D. Chabane Sari. **Viscosimetric study and synergistic antifungal activity of oils extract from three Algerian medicinal plants against toxigenic *Aspergillus*.** *Journal of medicinal plants research* vol.7(8), pp.404-412, 25 february, 2013.
3. **A.Amrouche**, H. Benmehdi, H. Dalile, M. Chabane Sari, I. Zaaboub, D. E Smahi, A. Moussaoui and D. Chabane Sari. **Evaluation of antifungal activity of free fatty acids methyl esters fraction isolated from Algerian *Linum usitatissimum* L. seeds against toxigenic *Aspergillus*.** *Asian Pac Jour Trop Biomed* 2013 ; 3(6) : 443-448.

PRESENTATIONS ORALES

1. **A.Amrouche**, A. Saneba, K. Mebarki, A. Moussaoui, D. Chabane Sari. **Évaluation de l'activité antifongique de quelques huiles (huile de coloquinte-huile de nigelle et huile de lin) sur une souche d'*Aspergillus flavus* productrice d'aflatoxines.** *Séminaire international sur les plantes médicinales « SIPM'2 » (Ouargla les 19 et 20 avril 2011).*

POSTERS PRESENTATIONS

1. **A.Amrouche**, A. Benyahia, A. Moussaoui, D. Chabane Sari. **Activité antifongique des huiles de *Citrullus colocynthis*, *Nigella sativa* et *Linum usitatissimum* sur une souche productrice d'aflatoxines.** *Congrès International de Nutrition. Oran le 22 et 23 Mai 2011.*
2. **A.Amrouche**, I. Zaaboub, R. Zaabat, H. Benmehdi, A. Lazouni. H, A. Moussaoui, and D. Chabane Sari. **Incorporation Assay of Colocynth And Nigella Oils In Diets For Wistar Rats Intoxicated With Ochratoxin A (OTA).** *Séminaire International "Cancer, Stress Cellulaire et Substance Bioactive" Jijel le 23-24 Septembre 2012.*
3. **FELLAH.K, A.Amrouche**, H. Benmehdi, Bedjaoui.S, khelif.A, A. Moussaoui, and .Chabane Sari. **Effet antifongique synergique de l'huile de coloquinte, de nigelle et de lin sur des moisissures d'altération du blé tender stocké.** *3^{ème} congrès maghrébin sur les toxi-infections alimentaires. TIA3-Constantine 2-4 avril 2013.*
4. **A.Amrouche**, H. Benmehdi, A. Moussaoui, and .Chabane Sari. **Study of antiaflatoxic effect of *Citrullus colocynthis* and *Nigella sativa* seeds oil on growing wistar rats.** *4th international workshop on industrial Biotechnology. April 10-11 2013. Tlemcen -Algeria*

Je dédie ce travail...

A mes étoiles

Mes parents, Meriem et mes enfants

Qui ont su m'accompagner

Jusqu'à ici de la plus belle et la

plus brillante des manières qui soit.

Mes parents

En signe de ma profonde et affectueuse reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils ont bien voulu consentir pour moi, que ces pages soient pour eux en témoignage de mon grand amour.

Meriem,

Pour sa patiente exclusive, ses encouragements interminables, sa compréhension réfléchie dans les tourments qui ont bouleversé immanquablement la vie familiale au moment de l'élaboration captive de ce travail.

Mes enfants,

Intissar, Imane, Mouncif et Omar je vous aime.

Je dédie ce travail à ceux qui œuvrent pour la science.

REMERCIEMENTS

Arrivé au terme de cette thèse, louange a **DIEU** le tout puissant de m'avoir donné la force et le courage de terminer a bon point ce travail. Si le soulagement d'être parvenue à réaliser ce travail contribue à un sentiment doux et agréable, celui-ci provient sans doute de mon plaisir d'adresser mes remerciements aux personnes qui m'ont entourée efficacement tout au long de cette aventure.

Je témoigne de toute ma reconnaissance au Professeur **CHABANE SARI DAUDI** et au Professeur **MOUSSAOUI ABDALLAH** pour m'avoir d'une part accueilli dans vos laboratoires de recherches –laboratoire produits naturels de l'université de Tlemcen et le laboratoire de valorisation des ressources végétales et sécurité des aliments dans les zones semi arides du sud ouest Algérien sis à l'université de Bechar-, soyez assuré messieurs de ma reconnaissance, d'autre part je ne saurais vous remercier assez pour m'avoir communiqué avec autant de ferveur vos connaissances dans les différents domaines de ce projet. Votre engagement en tant que directeur et co-directeur de thèse à été très enrichissant grâce a un judicieux mélange entre liberté et soutien. Je vous suis particulièrement reconnaissant pour votre grande disponibilité à discuter mes résultats ou mes prochains projets. Je pense avoir beaucoup appris à vos côtés, que ce soit sur le plan scientifique ou sur les rapports humains. Cette apprentissage est indélébile et me marquera a jamais. Merci encore une fois.

Je remercie chaleureusement madame le Professeur **ATIK BEKARA FOUZIA** de l'université de Tlemcen, de l'honneur qu'elle me fait en acceptant spontanément la lourde tâche de présider le jury de cette thèse. Trouvez ici l'expression de ma sincère reconnaissance pour cette marque d'intérêt.

Je suis sensible à l'honneur que me font madame le Professeur **MERZOUK HAFEDA** et madame le Professeur **BOUCHERIT-OTHMANI ZAHIA** de l'université de Tlemcen en acceptant d'être des rapporteurs de ce travail. Je suis très heureux de bénéficier de vos recommandations et je tiens à vous exprimer ma sincère reconnaissance pour votre intérêt. J'espère vraiment être à la hauteur de vos espérances.

Que monsieur le Professeur **MEDDAH BOUMEDIENNE** de l'université de Mascara ainsi que monsieur le Professeur **LAHOUAL MESBAH** de l'université de Jijel qui m'ont accordé de leurs temps et ont accepté de participer a cette commission d'examen. Trouvez ici

l'expression de mes sincères remerciements pour l'intérêt qu'ils ont voulu porter à ce travail. Merci également pour vos commentaires scientifiques quant à ce travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur **LAMOURI AAZDINE** ainsi que son équipe de l'unité mixte de recherche **CNRS ITODYS UFR DE CHIMIE** de l'université de Paris Diderot- Paris 7- France, pour leurs accueils au sein du laboratoire ainsi pour avoir réalisé les analyses spectrales.

Je remercie aussi Monsieur **MEKSEM AHMED** Maitre de conférences- université de Bruxelles - laboratoire de bactériologie moléculaire- pour son aide son soutien et ses conseils.

Je ne saurais passer sous silence la contribution de Monsieur **BENMEHDI HOUCINE** maitre de conférences à l'université de Bechar pour avoir participer activement à l'avancement de mes travaux surtout pour les interprétations des spectres. Je lui adresse une mention spéciale pour son aide précieuse au moment de l'élaboration des publications. Trouvez ici monsieur l'expression de mon entière reconnaissance et l'assurance de mon amitié sincère.

Evidemment, je tiens à remercier Monsieur **MAAZOUZI ABDELHAK** maitre de conférences à l'université de Bechar pour avoir attribué la logistique matériel et technique pour faire avancer ce travail de thèse. Je le remercie également pour son constant soutien moral, ces encouragements et surtout sa bonne humeur, soyez rassuré de mon amitié la plus sincère.

Je tiens à dresser mes sincères remerciements à Monsieur **BEDJAOUI SOFIANE** maitre assistant à l'université de Bechar pour sa collaboration sur la partie viscosimétrique. Soyez rassurer de ma reconnaissance.

Que mes dames **DALILE HALIMA, BOUDOUAIA ASMA et IHADADENE NABILA** maitres assistantes a l'université de Bechar qui ont participé activement soit a l'étude statistique de mes résultats, des analyses spectrales ou à la rédaction de cette thèse, trouvent ici l'expression de ma gratitude et de mon entière reconnaissance.

Merci à mes « petites mains », **Imane Zaaboub, Khadija fellah, Rym Zaabat, hasna Malainine**, ainsi que les autres pour avoir participé activement à l'avancement de mes travaux. Une mention très spéciale pour **imane** pour sa disponibilité au laboratoire au moment de la réalisation de différentes manipulations.

Je tiens également à remercier l'ensemble des enseignants chercheurs ainsi que tout le staff de biologie au sein du département des sciences dirigé par Monsieur **MEHDAOUI RAZLI** maître de conférences à l'université de Bechar qui je remercie aussi pour son soutien moral et ses directives.

Enfin, alors que cette thèse parachève ma formation scolaire, je voudrais terminer en remerciant infiniment ceux qui sont là depuis le début et qui ont posé les bases de ce que je suis aujourd'hui : mes parents et tous mes enseignants. Grand merci à vous.

ملخص

تهتم هذه الدراسة العلمية بالتقييم المخبري للمفعول المضاد للسموم الفطرية لدى الزيوت والأسترات الميثيلية للأحماض الدسمة المستخلصة من ثلاث نباتات طبية من منطقة بشار ألا وهي بذور الكتان " لينيو ماوزتيا تيسيموم" بذور الحبة السوداء "نجيلا ساتيفا", وبذور الحنظل " سينريلوس كولو كنتس" وذلك بهدف تثبيط فطري الأسبرجلوس فلافوس و الأسبرجلوس اوكراسيوس المنتجين للسموم. خلال هذه الدراسة , استعملنا طريقتين : النمو العرضي على الوسط المغذي الصلب و تقيم الكتل الحيوية في الوسط المغذي السائل. كما قمنا بإجراء اختبار حيوي لمعرفة تأثير تثبيط هذه الزيوت على فأر ويسطار طور النمو تمت تغذيته سابقا بوجبات ملوثة بكمية من السموم الفطرية : 125 ميكروغرام/غرام AFB₁ أو/و 250 ميكروغرام/ غ OTA

أثبتت الدراسة أن البذور المدروسة ذات مردودية عالية من الزيوت والاسترات وقد أظهرت التقنيات التحليلية الفيزيوكيميائية (خاصية اللزوجة والتحاليل الطيفية) ثراء الزيوت, الأسترات الميثيلية والأحماض الدسمة بحمض اللينوليك و اللينولينيك. كما أظهر تقييم المفعول المضاد للفطريات أن هذه الزيوت و أستراتها ساهمت بشكل كبير في تأخير نمو الفطريات المدروسة, كان هذا الاخير بنسبة كبيرة في الوسط المغذي الصلب واكثر فعالية على نمو الأسبرجلوس فلافوس بالمقارنة مع الأسبرجلوس او كراسيوس. أثبتت الدراسة أن الزيت المشتقة من بذور الكتان لينوم اوزيتاتيسوم و أستراتها أظهرت مؤشرات مضادة للفطريات اعلى من الزيوت الأخرى $I_{AF_{HL}}=55.65\%$ للأسبرجلوس فلافوس $I_{AF_{HL}}=42.46\%$ للأسبرجلوس او كراسيوس $I_{AF_{EML}}=42.46\%$ للأسبرجلوس او كراسيوس $I_{AF_{EML}}=52.04\%$ للأسبرجلوس فلافوس. كما أن دراسة المفعول المضاد للفطريات للزيوت الثلاثة مجتمعة أظهرت دعما لتثبيط النمو الفطري.

إن الدراسة الحيوية للمفعول المعدل للزيوت المشتقة من النباتات الصلبة المذكورة اظهرت أن هذه الزيوت تتمتع بخواص مثبتة و معدلة للوزن , للأبيض الدهني و البروتين بالإضافة إلى الترانساميناز. هذه التأثيرات عبارة عن دلائل توحى بالتحكم في مفعول السموم الفطرية.

على ضوء ما سبق يمكننا القول ان مفعول الزيوت والاسترات المستخلصة من هذه النباتات الطبية قد يكون حلا بديلا , فعالا و خاليا من الأعراض الجانبية, في ميدان محاربة السموم الفطرية بغرض الحفاظ على الصحة العمومية

الكلمات المفتاحية: زيوت, استرات ميثيلية ,النشاط المضاد للفطريات , اسرجيلوس

سموم فطرية, فأر ويسطار

Abstract

This study aimed to evaluate *in vitro* the antifungal activity of oils and their fatty acids methyl esters (FAMES) isolated from three medicinal plants growing in Bechar department (*Citrullus colocynthis* L., *Linum usitatissimum* L. and *Nigella sativa* L.) against mycotoxines *A. flavus* and *A. ochraceus*. Two methods were used in this investigation: radial growth on solid medium and the evaluation of the biomass on liquid medium. It seems also necessary in this study to test *in vivo* the stabilizing or corrective impact of the oil on growing Wistar rat contaminated by 125µg / g AFB₁ and / or 250µg / OTA

The extraction of the oils from the studied plants offered acceptable yields. The characterization of the oils as well as their fatty acids methyl esters (FAMES) *via* spectral analysis and viscosimetric study revealed that these later are rich in α -linolenic and linoleic acids.

The results of the antifungal evaluation showed that oils and their FAMES induced underdevelopment of the studied fungi. This later was more important on the solid medium and very marked on *A. flavus* than *A.ochraceus*. The oil of *Linum usitatissimum* and its FAMES showed the best antifungal percentage (IAF HL 55.65 % *A.flavus*-IAF HL 42.46 % *A. ochraceus*), (IAF HL 52.04 % *A.flavus*-IAF HL 42.46 % *A.ochraceus*). The synergistic antifungal essay combining the three oils revealed an improvement of the inhibition of the fungal growth.

In vivo study of the regulating power of oil extracted from *Citrullus colocynthis* L. and *Nigella sativa* L. showed stabilizing and corrective effects on physical weight, lipid and protein metabolism as well as on transaminases expression. These effects behave signs for a possible modulation of the impact of these mycotoxins.

In conclusion, these fractions can therefore be a cheap, effective and non-toxic alternative, for the antimicrobial as well as the clinical fields.

Keywords: oils, Fatty acids methyl esters, antifungal activity, mycotoxins, Wistar rat

Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer *in vitro* l'activité antifongique des huiles et de leurs esters méthyliques d'acides gras tous isolées à partir de trois plantes médicinales de la région de Bechar : *Citrullus colocynthis* L. , *Linum usitatissimum* L. et *Nigella sativa* L., en vue d'inhiber une flore fongique productrice de mycotoxines *A. flavus* et *A. ochraceus* . Deux méthodes ont été utilisées dans cette enquête : la croissance radiale sur milieu solide et l'évaluation de la biomasse sur milieu liquide. On a aussi testé *in vivo* l'impact stabilisateur voir correcteur des huiles chez le rat *wistar* en croissance contaminé par 125µg/g AFB1 et/ ou 250µg/g OTA.

Les graines étudiées ont fournies des rendements acceptables en huiles et en esters. La caractérisation de ces huiles ainsi que leurs esters méthyliques d'acides gras au moyen de techniques analytiques (étude viscosimétrique et spectrales) à démontré la richesse de ces huiles en acide α-linolénique et linoléique.

Les résultats de l'évaluation antifongique ont montrés que les huiles et leurs esters correspondants ont exercées un retard de croissance sur les champignons étudiés. Ce retard a été plus important sur le milieu solide et très marqué sur *A. flavus* qu'*A. ochraceus*. L'huile de *Linum usitatissimum* et ses esters concordants ont affichées les meilleurs indices antifongiques ($IAF_{HL} = 55.65\% A. flavus - IAF_{HL} = 42.46\% A. ochraceus$), ($IAF_{EML} = 52.04\% A. flavus - IAF_{EML} = 42.46\% A. ochraceus$). L'essai antifongique synergique combinant les trois huiles a révélée une amélioration de l'inhibition de la croissance fongique.

L'étude *in vivo* du pouvoir régulateur des huiles extraites des plantes médicinales (*Citrullus colocynthis* L. et de *Nigella sativa* L.) a montrée que ces huiles sont dotées d'effets stabilisateurs voir correcteur sur le poids corporel, le métabolisme lipidique et protéique ainsi que l'expression des transaminases. Ces actions sont des signes révélateurs d'une éventuelle modulation de l'impact des mycotoxines.

En conclusion, ces fractions peuvent donc constituer une alternative bon marché, efficace, avide de toxicité pour le domaine de lutte antimicrobienne ainsi que le domaine clinique.

Mots clés : Huiles, esters méthyliques, activité antifongique, *Aspergillus*, mycotoxines, Rat *wistar*.

LISTE DES ABREVIATIONS

A.f	<i>Aspergillus flavus</i>
A.o	<i>Aspergillus ochraceus</i>
AFAP	<i>Aspergillus flavus parasiticus</i> Agar
AFB₁	Aflatoxine B₁
AFM₁	Aflatoxine M₁
C*	Concentration micellaire critique
C.C.M	Chromatographie sur couche mince
C/N	Rapport carbone/nitrogène
CYA	Milieu au <i>CzapekYeast</i> Agar
DC	Diamètre de concentration
DT	Diamètre de témoin
E. Lin	Ester de lin
E. Ni	Ester de nigelle
E.Col	Ester de coloquinte
EBC	Ester brut de coloquinte
EBL	Ester brut de lin
EBN	Ester brut de nigelle
EMC	Ester majoritaire de coloquinte
EML	Ester majoritaire de lin
EMN	Ester majoritaire de nigelle
G25N	Milieu a 25% glycérol et nitrate
HC	Huile de coloquinte
HL	Huile de lin
HN	Huile de nigelle
IS	Indice de saponification
MEA	Milieu <i>Malt Extract</i> Agar
OTA	Ochratoxines A
η	Viscosité spécifique
η/C	Viscosité réduite
η_{red}	Viscosité réduite
η_{sp}	Viscosité spécifique
ALAT	<i>Alanine amino transférase</i>
ASAT	<i>Aspartate aminotransferase</i>

Liste des tableaux

<u>Tableau 1.1</u>	<i>Composition chimique des graines</i>	P16
<u>Tableau 1.2</u>	<i>Fractions lipidiques des graines</i>	P17
<u>Tableau 1.3</u>	<i>Principales caractéristiques de la graine de <i>Linum usitatissimum</i></i>	P20
<u>Tableau 1.4</u>	<i>Fractions lipidiques des graines</i>	P20
<u>Tableau 1.5</u>	<i>Composition chimique de l'huile de <i>NigellaSativa</i></i>	P23
<u>Tableau 1.6</u>	<i>Quelques travaux antérieurs sur <i>CitrulluscolocynthisL</i></i>	P25
<u>Tableau 1.7</u>	<i>Quelques travaux antérieurs sur <i>Nigella sativaL</i></i>	P26
<u>Tableau 1.8</u>	<i>Quelques travaux antérieurs sur <i>Linum usitatissimumL</i></i>	P27
<u>Tableau 2.1</u>	<i>Concentrations des esters bruts et majoritaires testées en milieu liquide</i>	P41
<u>Tableau 2.2</u>	<i>Composition des régimes en pourcentages pondéraux et en valeurs énergétiques</i>	P51
<u>Tableau 3.1</u>	<i>Récapitulation de la caractérisation physico-chimique des huiles</i>	P67
<u>Tableau 3.2</u>	<i>Concentrations spécifiques C* des huiles et des esters</i>	P68
<u>Tableau 3.3</u>	<i>Masses spécifiques des huiles et des esters</i>	P69
<u>Tableau 4.1</u>	<i>Identification des espèces <i>Aspergillus</i> (single spore)</i>	P124
<u>Tableau .5.1</u>	<i>Valeurs moyennes des poids des différents organes prélevés chez les différents groupes de rats étudiés intoxiqués par AFB1</i>	P172
<u>Tableau .5.2</u>	<i>Valeurs moyennes des poids des différents organes prélevés chez les différents groupes de rats étudiés intoxiqués par OTA</i>	P172
<u>Tableau .5.3</u>	<i>Valeurs moyennes des paramètres biochimiques des urines chez les différents groupes de rats</i>	P173

Listes des figures

Figure 1.1	Citrulluscolocynthis L	P16
Figure 1.2	Linumusitatisimum L.	P18
Figure 1.3	Nigellasativa L	P22
Figure 2.1	Carte géographiques des zones de prélèvement	P30
Figure 2.2	Viscosimètre capillaire (type Ubbelohde)	P44
Figure 2.3	Type d'inoculation des différents isolats d'Aspergillus	P47
Figure 2.4	Méthode d'extraction des aflatoxines et des ochratoxines	P49
Figure 2.5	Principe d'évaluation d'activité antifongique des huiles par la méthode de croissance radiale	P39
Figure 3.1	Valeurs moyennes des rendements des différents échantillons	P61
Figure 3.2	Résultats de la densité relative des différents échantillons	P62
Figure 3.3	Valeurs moyennes des indices de réfraction des différents échantillons	P62
Figure 3.4	Valeurs moyennes des indices de réfraction des différents échantillons	P63
Figure 3.5	indice de peroxyde des différents échantillons	P64
Figure 3.6	Valeurs moyennes de l'indice de saponification des différents échantillons	P64
Figure 3.7	Indice d'iode des différents échantillons	P66
Figure 3.8	Valeurs moyennes de la teneur en matières insaponifiables des Différents échantillons	P67
Figure 3.9	Viscosité spécifique η_{sp} des trois huiles en fonction de la concentration	P70
Figure 3.10	Viscosité réduite η_{red} des trois huiles en fonction de concentration	P70
Figure 3.11	Absorbance des trois huiles en fonction de la concentration	P70
Figure 3.12	viscosité spécifique η_{sp} des trois esters en fonction de la concentration	P71
Figure 3.13	viscosité réduite η_{red} des trois esters en fonction de la concentration	P71
Figure 3.14	Absorbance des trois esters en fonction de la concentration	P71
Figure 3.15	Tracés de la viscosité des combinaisons synergiques des huiles	P72
Figure 3.16	Tracés de la viscosité des combinaisons synergiques des esters	P73
Figure 3.17	Spectre GC de l'huile de Citrulluscolocynthis	P75
Figure 3.18	Spectre MS de l'huile de Citrulluscolocynthis	P75
Figure 3.19	Spectre GC de l'huile de Linumusitatisimum	P76
Figure 3.20	Spectre MS de l'huile de Linumusitatisimum	P76
Figure 3.21	Spectre GC de l'huile de Nigellasativa	P77
Figure 3.22	Spectre MS de l'huile de Nigellasativa	P77
Figure 3.23	Spectres infrarouge des huiles de Linumusitatisimum. L-Citrulluscolocynthis L - Nigellasativa L.	P81
Figure 3.25	chromatographie sur couche mince des esters bruts des différents échantillons	P83
Figure 3.26	chromatographie sur couche mince des esters majoritaires des différents échantillons	P84
Figure 3.27	Spectre GC de la fraction majoritaire d'esters méthyliques (FAMES) isolés de l'huile de Citrulluscolocynthis L.	P85
Figure 3.28	Spectre MS de l'ester méthylique d'acide palmitique isolé de l'huile de Citrulluscolocynthis L.	P86

Figure 3.29	Spectre MS des esters méthyliques d'acides α linoléique et linoléique isolés de l'huile de <i>Citrulluscolocynthis</i> L	P86
Figure 3.30	Spectre MS de l'ester méthylique d'acide stéarique isolé de l'huile de <i>Citrulluscolocynthis</i> L	P88
Figure 3.31	Spectre CG de la fraction majoritaire d'esters méthyliques (FAMES) isolés de l'huile de <i>Linumusatissimum</i> L	P88
Figure 3.32	Spectre MS de l'ester méthylique d'acide palmitique isolé de l'huile isolé de l'huile de <i>Linumusatissimum</i> L	P89
Figure 3.33	Spectre MS des esters méthyliques d'acides α linoléique et linoléique isolés de l'huile de <i>Linumusatissimum</i> L	P91
Figure 3.34	Spectre MS de l'ester méthylique d'acide stéarique isolé de l'huile de <i>Linumusatissimum</i> L	P91
Figure 3.35	Spectre GC de la fraction majoritaire d'esters méthyliques (FAMES) isolés de l'huile <i>Nigellasativa</i> L	P92
Figure 3.36	Spectre MS de l'ester méthylique d'acide palmitique isolé de l'huile isolé de l'huile de <i>Nigella sativa</i> L	P93
Figure 3.37	Spectre MS des esters méthyliques d'acides α linoléique et linoléique isolés de l'huile de <i>Nigella sativa</i> L	P93
Figure 3.38	Spectre MS de l'ester méthylique d'acide stéarique isolé de l'huile de <i>nigellasativa</i> L	P94
Figure 3.39	Spectre MS de l'ester méthylique d'acide isolé de l'huile de <i>Nigelasativa</i> L	P94
Figure 3.40	Spectre infrarouge de l'ester isolé de l'huile <i>Citrulluscolocynthis</i> L	P96
Figure 3.41	Spectre infrarouge de l'ester isolé de l'huile <i>Linumussitatissimum</i> L	P97
Figure 3.42	Spectre infrarouge de l'ester isolé de l'huile <i>Nigellasativa</i> L	P98
Figure 3.43	Spectre RMN. ¹ H de l'ester de <i>Citrullus colocynthis</i> L	P99
Figure 3.44	Spectre RMN. ¹ H de l'ester de <i>Linumusatissimum</i>	P100
Figure 3.45	Spectre RMN. ¹ H de l'ester de <i>Nigella sativa</i>	P101
Figure 3.46	Spectre RMN. ¹³ C de l'ester de <i>Citrulluscolocynthis</i>	P102
Figure 3.47	Spectre RMN. ¹³ C de l'ester de <i>Linum usitatissimum</i>	P103
Figure 3.48	Spectre RMN. ¹³ C de l'ester de <i>Nigella sativa</i>	P104
Figure 4.1	A, B : <i>Aspergillus flavus</i> sous microscope(x100), <i>Aspergillus flavus</i> par méthode de single spore C : sur milieu CYA à 37°C D : sur milieu MEA à 25°C, E : sur milieu G25N à 25°C, F : sur milieu AFAP à 25°C, J : sur AFAP reverse plate orange	P125
Figure 4.2	Specimens de photos d' <i>Aspergillus ochraceus</i>	P126
Figure 4.3	Chromatographique sur plaque des différents isolats des souches testées sur milieu YES	P127
Figure 4.4	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de l'huile de <i>Citrulluscolocynthis</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide.	P129
Figure 4.5	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de l'huile de <i>Linumusatissimum</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide	P130
Figure 4.6	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de l'huile de <i>Nigellasativa</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide	P131
Figure 4.7	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de l'huile de <i>Citrulluscolocynthis</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide.	P133
Figure 4.8	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de l'huile de <i>Linumusatissimum</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide	P134
Figure 4.9	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations de l'huile de <i>Nigellasativa</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide	P136
Figure 4.10	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations combinant les huiles de <i>Citrulluscolocynthis</i> et <i>Linumusatissimum</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide	P138

Figure 4.11	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations combinant les huiles de <i>Citrulluscolocynthis</i> et <i>Nigellasativa</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide	P139
Figure 4.14	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters extraits de l'huile de <i>Linumusatissimum</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide	P144
Figure 4.15	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters extraits de l'huile de <i>Citrulluscolocynthis</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide	P145
Figure 4.16	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters extraits de l'huile de <i>Nigellasativa</i> sur <i>A.flavus</i> et <i>A.ochraceus</i> sur milieu solide.	P146
Figure 4.17	Moyennes des poids des biomasses d' <i>Aspergillus flavus</i> formées sous les différentes concentrations des huiles extraits de <i>Citrullus colocynthis</i> - <i>Linum usitatisimum</i> et <i>Nigella sativa</i> sur milieu liquide	P148
Figure 4.18	Moyennes des poids des biomasses d' <i>Aspergillus ochraceus</i> formées sous les différentes concentrations des huiles extraits de <i>Citrullus colocynthis</i> - <i>Linum usitatisimum</i> et <i>Nigella sativa</i> sur milieu liquide	P148
Figure 4.19	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters bruts extraits des huiles de <i>Citrullus colocynthis</i> - <i>Linum usitatisimum</i> et <i>Nigella sativa</i> sur <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu liquide	P149
Figure 4.20	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters majoritaires extraits des huiles de <i>Citrullus colocynthis</i> - <i>Linum usitatisimum</i> et <i>Nigella sativa</i> sur <i>Aspergillus flavus</i> sur milieu liquide.	P149
Figure 4.21	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters bruts extraits des huiles de <i>Citrullus colocynthis</i> - <i>Linum usitatisimum</i> et <i>Nigella sativa</i> sur <i>Aspergillus ochraceus</i> sur milieu liquide.	P120
Figure 4.22	Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters majoritaires extraits des huiles de <i>Citrullus colocynthis</i> - <i>Linum usitatisimum</i> et <i>Nigella sativa</i> sur <i>Aspergillus ochraceus</i> sur milieu liquide	P120
Figure 5.1	Évolution du poids corporel moyen (g) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires durant un mois d'expérimentation	P169
Figure 5.2	Évolution du poids corporel moyen (g) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires durant un mois d'expérimentation	P170
Figure 5.3	Teneurs plasmatique moyennes de la glycémie (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.	P174
Figure 5.4	Teneurs moyennes de l'albumine sérique (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.	P176
Figure 5.5	Teneurs plasmatique moyennes des protéines totales (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation	P177
Figure 5.6	Teneurs sériques moyennes des triglycérides (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.	P179
Figure 5.7	Teneurs sériques moyennes du cholestérol (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.	P180
Figure 5.8	Teneurs sériques moyennes de l'urémie (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation	P181
Figure 5.9	Teneurs sériques moyennes de la créatininémie (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation	P182
Figure 5.10	Teneurs sériques moyennes de l'acide urique (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation	P183
Figure 5.12	Teneurs moyennes des ALAT plasmatiques (UI/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation	P186

Dédicace	III
Remerciement	IV

ملخص	VII
Abstract	VIII
Résumé	IX
Liste des abréviations et symboles	X
Liste des figures	XI
Liste des tableaux	XIII
Sommaire	XIV

Introduction	01
--------------	----

CHAPITRE 1

Synthèse bibliographique	04
--------------------------	----

CHAPITRE 2

MATERIELSET METHODES

2.1 Récolte du matériel	30
2.1.1 Séchage des graines	31
2.1.2 Extraction des huiles	31
2. 2 Caractérisation physicochimique des huiles	32
2.2.1 Caractéristiques physiques	32
2.2.1.1 Densité relative à 20°C (NF ISO 6883)	32
2.2.1.2 Indice de réfraction à 20°C (ISO 6320)	33
2.2.1.3 Point de congélation (NF T 75-102)	34
2.2.2Caractéristiques chimiques	34
2.2.2.1 Etude de l'altération	34
2.2.2.2 Etude des acides gras et des glycérides	36
2.2.2.3 Etude des constituants non glycéridiques	38
2.3 Étude viscosimétrique	40
2.4 Estérification des fractions huileuses	41
2. 4.1 Isolement des acides gras	41
2.4.2 Méthylation des acides gras	41
2.5 Analyse chromatographique des esters méthyliques	41
2.6 Evaluation microbiologique	42
2.6.1 Matériel fongique	42

2.6.1.1 Confirmation des souches testées	43
2.6.1.2 Test de mycotoxinogénie	45
2.7 Evaluation de l'activité antifongique des huiles	46
2.7.1 Croissance radiale sur milieu solide	46
2.7.1.1 Préparation de l'inoculum	46
2.7.1.2 Principe	46
2.7.1.3 Expressions des résultats	48
2.7.2 Évaluation de la biomasse sur milieu liquide	48
2.7.2.1 Préparation de l'inoculum	48
2.7.2.2 Principe	49
2.7.2.3 Expression des résultats	50
2.8 Expérimentation <i>invivo</i>	51
2.8.1 Matériel biologique	52
2.8.1.1 Choix et préparation des animaux	52
2.8.1.2 Evaluation de l'effet des huiles	53

CHAPITRE 3

Caractérisation des huiles étudiées

3.1 Introduction	58
3.2 Résultats	60
3.2.1 Rendement des extractions des huiles	60
3.2.2 Caractéristiques physico-chimiques des huiles	61
3.2.2.1 Caractéristiques physiques	62
3.2.2.2 Caractéristiques chimiques	63
3.2.3 Etude viscosimétrique	68
3.2.4 Analyses spectrales des huiles	74
3.2.4.1 Analyse par GC-MS	74
3.2.4.2 Analyse des huiles par Infrarouge (IR)	77
3.2.5 Séparation des esters	82
3.2.5.1 Rendements en esters	82
3.2.5.2 Séparation chromatographique	83
3.2.5.3 Analyses spectrales des esters issus des huiles	84
3.3 Discussion	104

CHAPITRE 4

ACTIVITES ANTIFONGIQUES DES HUILES ET DE LEURS ESTERS

4.1 Introduction	117
4.2 Résultats	124

4.3 Confirmation de l'identité des souches testées	124
4.4 Test de mycotoxinogénie	125
4.5 Evaluation de l'activité antifongique des huiles	127
4.5.1 Croissance radiale sur milieu solide	128
4.5.1.1 Résultats du test préalable de l'activité antifongique	128
4.5.1.2 Effet antifongique des huiles	123
4.5.1.3 Effets antifongique synergique des huiles	135
4.5.1.4 Effet antifongique des esters isolés des huiles testées	143
4.5.2 Evaluation de la biomasse sur milieu liquide	147
4.5.2.1 Effet antifongique des huiles en milieu liquide	147
4.5.2.2 Effet antifongique des esters en milieu liquide	147
4.5 Discussion	152

CHAPITRE 5

ETUDE IN VIVO DE L'EFFET REGULATEUR DES HUILES (HUILE DE CITRULLUS COLOCYNTHIS, HUILE DE NIGELLA SATIVA) CHEZ LE RAT INTOXIQUE PAR DES MYCOTOXINES

5.1 Introduction	164
5.2 Résultats	168
5.2 Évolution du poids corporel moyen et gain de poids	168
5.2.2 Quantité d'aliment et d'OTA ingérée	171
5.2.3 Poids des organes	171
5.2.4 Analyses biochimiques des urines	173
5.2.5 Analyses biochimiques du sang	173
5.2.5.1 Teneurs moyennes de la glycémie	173
5.2.5.2 Valeurs moyennes de l'albumine	175
5.2.5.3 Valeurs moyennes des protéines totales	175
5.2.5.4 Valeurs moyennes des triglycérides et du cholestérol total	178
5.2.5.5 Valeurs moyennes de l'urée, des créatinines et de l'acide urique	178
5.2.5.6 Valeurs moyennes des transaminases (ALAT et ASAT)	183
Conclusion Générale	199
Références Bibliographiques	200
Annexes	

Introduction Générales

INTRODUCTION GENERALE

La prévention des risques de contamination des produits alimentaires par les moisissures et les mycotoxines constitue un défi majeur pour les intervenants dans les chaînes agroalimentaires. Diverses stratégies peuvent exister afin d'essayer de limiter le développement fongique ainsi la production des mycotoxines au champ, à la récolte et lors du stockage. Malgré toutes les précautions prises pour prévenir la présence de la flore fongique et ses toxines *via* les aliments, des accidents surviennent encore car il est impossible en matière de sécurité alimentaire de garantir un risque zéro.

Devant la problématique grandissante de la contamination fongique, la production des mycotoxines et l'émergence d'un sentiment d'insécurité, l'on assiste de plus en plus à l'installation de nouvelles stratégies préventives visant à limiter la contamination fongique, réduire voire empêcher la production des mycotoxines. Dans ce but, de nombreux chercheurs se sont orientés vers des alternatives de réductions ou de lutte contre cette contamination, telle que la lutte naturelle fondé sur l'utilisation des différents métabolites des plantes médicinales en vue d'une contribution à leur valorisation, en raison de leurs efficacités, et leurs coût moins élevé par rapport aux autres méthodes de réductions.

Les plantes constituent actuellement une source prioritaire et un réservoir inépuisable de nouvelles substances biologiquement actives, leur structure et la nature chimique de leurs constituants leur confère de grandes perspectives d'application.

L'utilisation des plantes médicinales comme source de remède pour se soigner ou prévenir des maladies est bien connu depuis des millénaires jusqu'aux récentes civilisations. Au fil des siècles, la thérapeutique par les plantes s'est dissociée des pratiques magiques pour devenir empirique puis scientifique dont sa valorisation demande une parfaite connaissance des propriétés à mettre en valeur.

De nos jours, l'utilisation des plantes médicinales en phytothérapie a reçu un grand intérêt dans la recherche biomédicale et devient aussi importante que la chimiothérapie. Ce regain d'intérêt vient du fait que les plantes médicinales représentent une source inépuisable de composés naturels bioactifs et d'autres parts du besoin de la recherche d'une meilleure médication par une thérapie plus douce sans effets secondaires. Un large

spectre de substances biologiques extraites à partir des plantes médicinales, notamment les huiles ont été testées pour substituer à certains moyens de lutte contre les xénobiotiques notamment ceux fongiques. Dans ce volet plusieurs auteurs ont confirmés l'efficacité des huiles sur des souches toxigènes de champignons.

Ce travail s'inscrit dans le cadre de la valorisation de la flore locale d'intérêt thérapeutique. Nous nous intéressons aux métabolites primaires (huiles) issus des graines de certaines plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle dans le but de réduire une flore fongique toxigène productrice de mycotoxines. Notamment l'évaluation de l'impact régulateur probable de ces métabolites primaires sur la toxicité de ces molécules fongiques.

Les principaux objectifs visés dans ce travail peuvent être résumés comme suit :

1. Extraction des huiles à partir des graines sélectionnées. caractérisation physico-chimiques de ces fractions :
 - Investigation physicochimique (détermination des indices physiques, chimiques ainsi que les indices de qualité).
 - Estérification et séparation chromatographique de la fraction méthylique d'acides gras (FAME's) ou composé majoritaire de chaque fraction huileuse.
 - Analyses spectrales du composé majoritaire (FAME's) entre autre (CPG SM, ^1H RMN, ^{13}C RMN, IR).
 - Etude du comportement viscosimétrique des fractions huileuses et des fractions méthyliques d'acides gras (FAME's) de ces huiles.
2. Evaluation de l'activité antifongique de ces huiles sur des champignons toxigènes :
 - Test antifongique des huiles sur des souches *Aspergillus* toxigènes.
 - Essai synergique de ces fractions sur ces champignons.
 - Essai de l'activité antifongique des fractions de méthyles d'acides gras (FAME's) sur ces mêmes souches
3. étude *in vivo* de l'effet régulateur probable de ces huiles (huile de *Citrullus colocynthis* L. et l'huile de *Nigella sativa* L.) sur des modèles expérimentaux d'animaux de rats intoxiqués par des mycotoxines.

Chapitre 1

Synthèse bibliographique

Les systèmes de sécurité sanitaire des aliments des pays développés et de ceux en voie de développement connaissent des difficultés sans précédent dues à l'urbanisation rapide, à la mondialisation du commerce alimentaire, à l'évolution des modes de consommation, et aux techniques de production alimentaires plus intensive (**BECILA, 2009**). La sécurité alimentaire notamment la qualité microbiologique des aliments, est une composante essentielle, elle représente un enjeu considérable. Sur le plan du commerce international, elle est très souvent invoquée pour renforcer les barrières aux importations (**BECILA, 2009**). De plus, elle a un rôle évident à jouer dans la prévention des maladies alimentaires. Ces maladies constituent à l'heure actuelle l'un des problèmes de santé publique les plus répandus à l'échelle internationale. Leurs répercussions sur la santé et sur l'économie mondiale sont de plus en plus fréquentes par divers agents en particulier les microorganismes pathogènes (**ZINEDINE, 2004**).

La production d'une alimentation de qualité pour une population mondiale croissante demeure un défi majeur du XXI^e siècle (**CEBALLOS, 2007**), à cause des événements récents tel que la crise de la vache folle, les problèmes de nitrate, de pesticides, de dioxines ou encore ceux de listériose ou de salmonellose, qui ont touché à la sécurité alimentaire et contribué à sensibiliser l'ensemble de la filière agroalimentaire aux risques potentiels de certains contaminants microscopiques (**NORBONNE, 1999**), c'est dans cet axe que la problématique de détérioration des denrées alimentaires à cause des champignons microscopiques ou moisissures suscite un intérêt grandissant depuis quelques dizaines d'années en raison des progrès réalisés dans la détection et l'identification de ces micro-organismes dans les différentes matrices alimentaires (**FILTENBORG, 1996**).

En plus, des virus, des bactéries pathogènes, les champignons toxigènes constituent un danger réel pour la santé de l'homme et l'animal par la sécrétion de substances hautement toxiques (**ZINEDINE, 2004**). Parmi la multitude de contaminants connus à nos jours, les mycotoxines sont des substances naturelles produites par les métabolismes secondaires des moisissures (**EL KHOURY, 2007**). Les moisissures sont des micro-organismes eucaryotes ubiquitaires, sans chlorophylles et dont l'appareil végétatif appelé thalle, composé de filaments ramifiés dont l'ensemble constitue le mycélium (**BENSAMIRA, 2006 ; DAO, 2005**). Sur le plan biochimique, ils sont caractérisés par la présence d'une paroi constituée essentiellement de polysaccharides notamment la chitine, l'ergostérol constitue le principal stérol de leur membrane (**CHABASSE, 2002**).

Les moisissures sont omniprésents, dans le sol, dans l'air, sur les vêtements, les plantes, et surtout sur les aliments. Ces derniers sont généralement des milieux très favorables à leur développement (**DAO, 2005**). Ces propagules fongiques se reproduisent par voie sexuée ou asexuée. La reproduction sexuée peut se faire de plusieurs façons mais la voie asexuée la plus connue est la production des spores. Ces spores sont des petites cellules ovales ou sphériques qui vont être capables de se développer. Elles sont très résistantes à la chaleur, les rayons UV, la dessiccation et déterminent un potentiel de dissémination (**FAILLE & ADRIANOR, 2006**).

Produites par ces moisissures, les mycotoxines ont été un fléau pour l'humanité depuis les premiers temps de la culture sédentaire (**FAO, 2003**). La découverte des mycotoxines élaborées par certains champignons, notamment les genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*, n'a fait qu'accentuer les soucis des agriculteurs, industriels, scientifiques et simples consommateurs, quant à la salubrité des produits alimentaires (**CASTEGNARO et al. , 2002**). La synthèse de ces contaminants peut avoir lieu avant ou après la récolte, durant l'entreposage, le transport ou la transformation du produit (**FAO, 1997 ; PFOHL- LESZKOWICZ, 1999**), il s'agit d'un phénomène d'une grande complexité qui dépend d'une combinaison des facteurs température et humidité ainsi que de l'oxygénation au niveau du substrat. Les stress thermique, hydrique et physique favorisent la contamination par les moisissures et par la suite la synthèse de mycotoxines (**HARRIS & STAPLES, 1992 ; DOWD, 1998; YIANNIKOURIS & JOUANY, 2002**), qui sont souvent présentes en mélange et constituent un risque pour les consommateurs en raison de leur synergie (**YIANNIKOURIS et al., 2003**).

Parmi l'ensemble des mycotoxines qui peuvent être retrouvées sur les aliments, seulement certaines contaminent l'alimentation humaine et constituent de ce fait, un risque pour la santé. Les plus importantes sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, la zéaralénone, les fumonisines, la citrinine, la patuline, l'acide pénicillique, et les trichotécènes (**D'MELLO & DONALD, 1997 ; SCUDAMORE & LIVESEY, 1998, PFOHL-LESZKOWICZ, 1999a, 2002 ; PFOHL-LESZKOWICZ & CASTEGNARO, 2002 ; BENNET & KLICH, 2003**). Les denrées alimentaires contaminées sont les matières premières comme les fruits et les fruits secs, les céréales, mais également les produits transformés comme le pain, la farine, les pâtes ou les jus de fruits. Quelques exemples de contaminations en moisissures et mycotoxines des denrées.

Ainsi, une même denrée peut être sujette à de multiples contaminations. De plus, un champignon toxigène peut produire plusieurs mycotoxines, et des mycotoxines identiques

peuvent être synthétisées par des champignons de genres et d'espèces différentes. La présence de ces champignons toxigènes sur une denrée n'est pas nécessairement le signe d'une contamination par des mycotoxines : la production de mycotoxines par le champignon aura lieu uniquement si les conditions environnementales favorables à cette contamination sont réunies. Ainsi, les paramètres environnementaux tels que le taux d'humidité, la température, la présence d'oxygène ou la composition du substrat, conditionneront le développement des moisissures et la production de mycotoxines (**OMINSKI et al., 1994 ; PFOHL-LESZKOWICZ, 1999b, 2002 ; LE BARS, 2002**). Selon l'Organisation Mondiale de la santé, près de 25% des denrées sont contaminées par des mycotoxines.

La palette des effets néfastes des mycotoxines sur la santé humaine et animale est très étendue et parfois méconnue (**BROCHARD & LE BACLE, 2009 ; QUILLIEN, 2002**). Elle demeure délicate car le risque mycotoxique est d'aisance naturelle, l'homme n'en maîtrisant pas la survenue ; il est pernicieux du fait que la contamination fongique est difficilement contrôlable et enfin, il peut être multiple en raison de la possible association d'effets de toxines produites par une même moisissure (**LOISEAU et al., 2005**), une vingtaine de familles des mycotoxines posent des problèmes en alimentation humaine et animale (**TOZLOVANU, 2008**).

Les Aflatoxines ont été les premières mycotoxines identifiées par les chercheurs, et sont aujourd'hui les plus connues et les plus étudiées parce qu'elles sont fortement toxiques et potentiellement cancérigènes (**QUILLIEN, 2002**). Il s'agit d'une famille nombreuse : on connaît actuellement une vingtaine d'aflatoxines, dont environ 10 peuvent être synthétisées par des *Aspergillus flavus*, les autres étant des produits de transformation par les animaux ou les bactéries (**FRAYSSINET & FREMY, 1999**). Les principales aflatoxines rencontrées dans les produits végétaux sont : B1, B2, G1 et G2, Plus deux formes supplémentaires : M1 et M2 (qui peuvent être formées à partir des aflatoxines B et G). L'aflatoxine B1 est le membre principal de la famille des mycotoxines et à un pouvoir cancérigène extrêmement élevé.

L'aflatoxine a été découverte en 1960 après une manifestation toxique grave parmi des animaux de ferme en Angleterre, qui est devenue notoire en tant que (« turkey X disease » ou maladie de la dinde) en raison du grand nombre de poulets de Turquie atteints. Les canetons mis bas furent également affectés. Leur alimentation à base d'arachide, qui avait été fortement infestée par la moisissure *Aspergillus flavus*, était la cause de la maladie (**PFOHL LESZKOWICZ, 1999 ; YANNIKOURIS & JOUANY, 2002**).

Trois souches d'*Aspergillus* sont connues pour leur capacité à synthétiser des aflatoxines. ***Aspergillus flavus***, produit principalement l'aflatoxine B1 et l'aflatoxine B2 alors qu'il ne produit habituellement ni d'aflatoxine G1 ni d'aflatoxine G2, bien que quelques rares exceptions aient été décrites. ***Aspergillus parasiticus***, produit les quatre aflatoxines. ***Aspergillus nomius***, une souche rare proche d'*A.flavus*, est capable de produire des aflatoxines. Les conditions les plus favorables pour une croissance et une production optimales en aflatoxines par *A.flavus* sont une activité en eau (aw) relativement faible (0,84-0,86) ainsi qu'une température élevée entre 25 et 40 °C (CASTEGNARO & PFOHL LESZKOWICZ, 1999)

Les aflatoxines sont des molécules ne contenant pas d'azote, elles sont synthétisées uniquement à partir d'acétate par la voie métabolique qui conduit aux stérols. Elles présentent une ressemblance très grande avec certaines hormones stéroïdes. Ce sont des dérivés coumariniques, de structure extrêmement active sur le plan biologique, et elles en possèdent la fonction lactone. Cette fonction est facilement hydrolysée en milieu alcalin. Elles possèdent un groupement bifurannique qui se retrouve dans beaucoup d'autres toxines mycéliennes, et qui constitue une structure plane à une extrémité de la molécule. Ce groupement permet des interactions spécifiques avec certains constituants cellulaires et son ouverture abolit la toxicité (FRAYSSINET & FREMY, 1999).

Les aflatoxines sont des cristaux incolores ou jaune pâle fluorescents de façon très intense sous lumière ultraviolette. Eclairées à 365 nm, les aflatoxines B1 et B2 émettent une fluorescence bleue et les aflatoxines G1, G2, une fluorescence vert jaune. Ces couleurs de fluorescence sont à l'origine du nom des mycotoxines (B pour Blue et G pour green), et permettent leur détection et leur dosage après séparation par chromatographie sur couche mince (CCM).

Ces molécules sont solubles dans les solvants polaires (chloroforme et alcool méthylique) tout particulièrement le diméthylsulfoxyde ; Elles sont insolubles dans l'eau et dans les solvants non polaires. Elles sont thermostables, ne présentant une dégradation appréciable qu'à partir de 150°, c'est à dire qu'elles résistent aux procédés de cuisson et de stérilisation. Elles sont également stables au cours d'un stockage prolongé, et les produits contaminés conservent leurs contaminations intactes pendant plusieurs années. Par contre, elles se dégradent rapidement en milieu alcalin et en présence d'ammoniac et d'hypochlorite de sodium. Lors de cette dernière réaction, il se forme le 2,3-dichloro-aflatoxine B1 qui est directement génotoxique. En outre, les

aflatoxines sont instables sous lumière ultraviolette en présence d'oxygène, à pH extrêmes (pH < 3 ou pH > 10) et en présence d'oxydants (**FRAYSSINET & FREMY, 1999 ; CASTEGNARO & PFOHL LESZKOWICZ, 1999**).

L'absorption des aflatoxines peut avoir lieu par voie orale et trachéale. Elle est rapide et s'effectue au niveau de l'intestin grêle dans sa partie duodénale. L'aflatoxine B₁ (AFB₁) rejoint le foie par la veine porte ; sa distribution à partir du plasma dans les hépatocytes est réalisée par diffusion passive à travers les membranes.

Une partie de l'AFB₁ est éliminée dans la bile après biotransformation sous forme conjuguée au glutathion, à l'acide glucuronique et au sulfate. Cette sécrétion biliaire représente environ 50 % de la dose excrétée chez la plupart des espèces animales. Quinze à 25 % de la dose ingérée sont éliminés par voie urinaire sous forme de dérivés conjugués ou sous forme inchangée (**CASTEGNARO, 1999 ; YANNIKOURIS & JOUANY, 2002**).

L'épithélium intestinal, le foie et les reins sont le siège de biotransformations d'un grand nombre de composés impliquant deux phases de réactions. La première fait intervenir des réactions de réduction, d'oxydation et d'hydrolase. Les cytochromes P450 microsomaux, les mono oxygénases, des synthétases de prostaglandines, des amines oxydases sont les enzymes majeures impliquées dans les oxydations, tandis que les réactions réductrices sont gouvernées par des époxydes hydrolases, et des aldéhydes réductases. La deuxième phase comporte les réactions de conjugaison des molécules formées durant la première phase, elle implique les glucuronosyl -transférases microsomales et les sulfonyl, méthyl- et N-acétyl-trasférases cytosoliques.

Ces réactions diminuent la toxicité et augmentent la solubilité dans l'eau des mycotoxines, ce qui facilite leur excrétion dans l'urine (et dans le lait) et protège l'animal, mais pourrait constituer un risque pour le consommateur (**YANNIKOURIS & JOUANY, 2002**).

Pour être toxique ou mutagène, l'AFB₁ doit être métabolisée. En effet sans activation métabolique l'AFB₁ n'est pas mutagène et ne se fixe pas sur les macromolécules. La métabolisation de l'AFB₁ est principalement réalisée par l'intervention des cytochromes hépatiques. Elle peut aussi être co-oxydée par la prostaglandine H synthétase et la lipoxygénase. Elle est principalement transformée en 8 métabolites : l'époxyde -AFB₁, l'AFM₁, l'AFB_{2a}, l'AFQ₁,

l'AFP₁, l'aflatoxicol, l'aflatoxicol H₁ et aflatoxicol M₁. Ces métabolites à l'exception de l'époxyde et de l'AFM₁ sont généralement moins toxiques (**PFOHL- LESZKOWICZ, 1999**).

Les effets des aflatoxines sur la santé animale varient suivant l'espèce. Les animaux comme le veau, le poulet, le caneton, le cobaye et le porc sont sensibles à l'AFB₁ alors que la chèvre, le mouton, le rat et la souris sont relativement résistants. Ainsi la DL₅₀ varie de 0,3 mg/kg de poids corporel pour le caneton à 9 pour la souris (**CASTEGNARO, 1999**).

La contamination aiguë, provoque des lésions du foie induisant des congestions et des hémorragies, une accumulation d'acides gras dans le foie, les reins et le cœur, et peut être à l'origine d'encéphalopathies et d'œdèmes. La mort de l'animal peut survenir en quelques heures ou quelques jours (**YANNIKOURIS & JOUANY, 2002**).

La contamination chronique peut se manifester par une cirrhose du foie avec ascite et œdème viscéral (observée chez les veaux ayant ingère pendant 04 mois une nourriture contenant 2 mg/kg pc d'AFB₁). L'aflatoxine provoque une diminution de poids et une diminution de la production de lait chez la vache (**CASTEGNARO, 1999**).

Le risque tératogène existe, il peut conduire à une forte proportion de malformation voire à des avortements. Pour des doses relativement importantes en aflatoxines (0,3-6 mg/kg pc), l'immunodépression s'installe, avec une baisse des immunoglobulines G et A. l'AFB₁ diminue la production des interleukines 1 et 2 par les cellules T et provoque aussi une hyperplasie du thymus. Les réactions d'hyper sensibilité sont supprimées (**CASTEGNARO, 1999**).

L'implication des aflatoxines dans la pathologie humaine n'est connue qu'en 1967 à la suite d'épidémie survenant en Taiwan et en Ouganda. A Taiwan, en 1967, **LING et al., 1967** décrivent une intoxication à l'aflatoxine se manifestant par des œdèmes des jambes et des pieds, des douleurs abdominales, des vomissements et une hépatomégalie, 200 µg d'AFB₁/kg sont alors retrouvées au niveau du riz ingéré. Les complications neurologiques apparaissent ultérieurement ; convulsions, coma, troubles respiratoires et la mort en 72 heures.

La cancérogenèse induite par de nombreuses mycotoxines est reconnue par le Centre International de Recherche sur le Cancer (**CIRC**) qui classe l'aflatoxine B₁ dans le groupe 1 (effet cancérogène certain pour l'homme) (**CHAMP, 1994**). La cancérogenèse hépatique est prépondérante, elle résulte de la transformation L'aflatoxine en un dérivé époxyde capable de

réagir avec la guanine sur laquelle elle peut provoquer des adduits de l'ADN (**YANNIKOURIS & JOUANY, 2002** ; **PFOHL LESZKOWICZ, 1999** ; **CHAMP, 1994**). L'exposition prolongée à l'aflatoxine B₁ par voie inhalatrice (ouvriers agricoles) coïncide avec l'augmentation du risque du cancer broncho pulmonaire jusqu'à deux fois (**CHAMP, 1994**).

Le deuxième groupe de mycotoxine classé comme cancérogène avéré par le centre international de recherche contre le cancer (CIRC) est celui des ochratoxines. Contaminant majeur de l'alimentation des animaux d'élevage par l'intermédiaire des céréales et des farines et de celle de l'alimentation humaine par le biais de la chaîne alimentaire (**EL KHOURY, 2007**). La famille des ochratoxines comprend une dizaine de molécules connues, mais l'ochratoxine A est le représentant le plus important (**TABUC, 2007**). L'OTA a reçu beaucoup d'attention ces dernières années (**HUYBRECHTS et al., 2010**), en raison de l'importance et de la diversité de ces effets toxiques (**TOZLOVANU, 2008**). L'OTA est produite principalement par *P. verrucosum* dans les régions tempérées (**LUND & FRISVAD, 2003**) alors que dans les zones chaudes plusieurs espèces peuvent synthétiser cette toxine : *A. ochraceus*, *A. carbonarius* et *A. niger* (**ABARACA et al., 2001**). Elle développe une structure générale de la L-β-phénylalanine liée par une liaison amide à un groupement dihydro- isocoumarine substitué (**DUARTE et al., 2010**), une forme cristalline variant de l'incolore au blanc, et une masse molaire de 403,8 g/mol, avec un pKa de 7,2 (**EL KHOURY, 2007**).

Les voies de sa biosynthèse fongique ne sont pas complètement établies, cependant, des expériences utilisant des précurseurs marqués au C14 ont montré que la partie phénylalanine provient de la voie des acides shikimiques alors que la partie dihydrocoumarinique (Ota) provient de la voie des polyketides (**RINGOT et al., 2006**). Une fois formées, une enzyme libre de la cellule : l'OTA synthétase, qui a besoin d'ATP et d'ions Mg⁺⁺ catalyse la liaison de l'OTA avec la phénylalanine (**HARRIS et al., 2001**).

La particularité de cette toxine est due à sa stabilité élevée, elle est résistante à l'acidité et aux hautes températures. Ainsi, une fois contaminées, les denrées alimentaires peuvent difficilement être débarrassées d'elle (**EL KHOURY, 2007**), ces propriétés offrent à l'OTA un pouvoir infestant de différentes productions de plantes, incluant les céréales, le café, les cacahuètes, la bière, le vin, les épices et les jus de fruits (**VARGA et al., 2003**), les céréales sont manifestement les principales sources d'exposition de cette toxine pour l'homme par le régime

alimentaire (**BELKACEM, 2007**). L'OTA est intégrée dans la chaîne alimentaire soit par consommation directe de produits contaminés céréaliers ou dérivés soit par consommation de produits carnés provenant des animaux nourris avec des grains contaminés (**ROYER, 2004**). On peut en effet retrouver de l'OTA éventuellement dans d'autres produits d'origine animale comme le lait voire les œufs mais plutôt à l'état de traces (**VRABCHEVA et al., 2004**). En conséquence, l'OTA a été détectée dans des échantillons de sang humain d'individus en bonne santé de divers pays du monde (**THUVANDER et al., 1996**), ce qui confirme la large exposition à cette molécule (**ATOUI, 2006**), en raison de son climat, de sa position géographique et des conditions socioéconomiques de sa population, l'Algérie présente toutes les conditions favorables à la prolifération des moisissures productrices d'OTA, en effet **KHALEF et al., 1993** mesurent des teneurs en OTA supérieure à 0,1 ng/ml dans 67% de 346 échantillons collectés dans une population algérienne (apparemment saine) et 95% de 84% échantillons collectés dans une population de néphropathies.

Le statut toxicologique de l'OTA a été examiné de nombreuses fois et a fait l'objet d'une monographie complète par le CIRC (**Centre International de Recherche sur le Cancer**) en 1993 (**IARC, 1993**). À la suite de la découverte des néphropathies spontanées humaines et animales, des études expérimentales ont été menées afin de démontrer l'implication de l'OTA dans ces maladies.

Des études toxicologiques réalisées sur des animaux de laboratoire (**ZIMMERLI & DICK, 1996 ; DAI et al., 2003 ; DA ROCHA ROSA et al., 2002 ; SHARMA & al., 2004 ; VISCONTI et al., 1999 ; OSPITAL et al., 1998 ; OTTENEDER et al., 2000**) ont montré que cette toxine est rattachée à plusieurs effets, tel que des effets néphrotoxiques, génotoxiques, immunosuppresseurs, tératogènes, neurotoxiques et cancérigènes (**LOPES, 2009**). Ce dernier point a été envisagé dès 1971 par **PURCHASE & VAN DER WATT** suite au fait qu'un rat, parmi un groupe de 10 rats *Wistar* ayant reçu chacun une dose de 300 µg/kg d'OTA, 5 jours par semaine pendant 50 semaines, avait développé un cancer rénal (**TOZLOVANU, 2008**). Cependant ce statut reste très variable et dépend du sexe, et du type cellulaire (**O'BRIEN et al., 2001**), une fois ingérée, l'OTA est partiellement absorbée par la diffusion passive de la forme non ionisée à travers la paroi de l'estomac (**FAUCET, 2005**). Cependant, comme le vidage gastrique est rapide, l'absorption s'effectue principalement au niveau de la partie proximale du jéjunum (**KANISAWA et al., 1990**).

Dans le plasma, l'OTA est fixée à 90% sur certaines protéines plasmatiques principalement l'albumine (**IL'ICHEV et al., 2002**), elle forme une liaison de forte affinité ce qui contribue à sa longue rétention dans l'organisme (**LATES, 2011**), sa distribution dans les différents organes varie en fonction de l'espèce et de son mode d'administration, mais également en fonction du temps (**CANADAS, 2006**), le rein est l'organe cible de l'action toxique de l'OTA mais celle-ci pourra également toucher le foie, le cœur ou les intestins (**POHLAND et al., 1992 ; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002 ; PFOHL-LESZKOWICZ , 1999**). Chez les rats Wistar, l'exposition à l'OTA montre une distribution, après 24 heures, principalement au niveau stomacal puis dans le foie, les reins, les poumons, le cœur et le cerveau. Quarante huit heures après l'administration, la distribution de l'OTA est modifiée, les concentrations maximales étant alors présentes dans le foie, l'estomac, et les poumons (**TOZLOVANU, 2008**), toutefois l'OTA est éliminée par toutes les voies d'excrétion : urinaire, fécale et biliaire, cette dernière et la filtration glomérulaire, jouent un rôle important dans la clairance corporelle totale de l'OTA (**FUCHS et al., 1988 ; FAUCET, 2005**). La contribution et l'intensité de chacune de ces voies sont en fonction de la dose, la distribution tissulaire, de la voie d'administration, du métabolisme de la toxine et du degré de fixation aux macromolécules sériques (**FAUCET, 2005**). Face à ces intoxications affectant les espèces animales et l'homme (**ROUVIER, 2002**), les stratégies visant à réduire la toxicité de l'OTA après son absorption dans l'organisme (**QUILLIEN, 2002**) comportent donc un intérêt évident (**MOHAMMEDI et al., 2010**). En pratique, à ce jour, aucun remède ne peut encore être proposé pour traiter l'intoxication humaine (**LAUWERYS, 2007**) par l'OTA. Une des voies de la recherche actuelle est le recours à la pharmacopée traditionnelle, en plus d'offrir des possibilités de traitements efficaces et accessibles pour les pathologies prévalant dans les communautés, elle constitue aussi un héritage culturel national et un moyen de relier les populations à leur propre histoire et à leur propre culture (**GIANI, 2004**), en outre les plantes constituent une source prioritaire et un réservoir inépuisable pour la recherche des substances biologiquement actives (**CHEMLI , 2008**).

Devant ce constat et face à l'émergence d'un sentiment d'insécurité, l'on assiste de plus en plus à la mise en place des stratégies préventives limitant ces contaminations et des traitements industriels visant à décontaminer les denrées alimentaires. Cependant, les procédés alimentaires usuels (cuisson, lyophilisation, congélation) ne peuvent en général au mieux que détruire partiellement la plupart des mycotoxines présentes dans les aliments (**SCOTT, 1996 ; BULLERMAN et al., 2002 ; PARK, 2002 ; RYU et al, 2002**).

Le problème de réduction des mycotoxines et la flore fongique productrice est plutôt complexe, plusieurs méthodes ont été proposées pour combattre la contamination par les mycotoxines en s'attaquant au développement des moisissures (**CANNET, 1999**). On distingue pour la lutte des moisissures des méthodes physiques, chimiques, et biologiques. Les méthodes physiques sont des techniques très diverses, allant du simple tri, élimination des graines contaminées, lavage et séparation des poussières jusqu'à des méthodes plus drastiques comme le traitement thermique à haute température, la torréfaction, l'irradiation par UV, rayon X ou micro-ondes (**DELFOSE & HORNIK, 2004 ; FANGEAT, 2008**) et adsorption qui constitue une méthode de décontamination de plus en plus utilisée quand les mycotoxines sont présents dans les aliments. Cette technique peut se révéler très performante pour certaines toxines, sous la réserve du choix approprié de l'adsorbant ou ligand inorganique (**GUERRE, 2000 ; JOUANY, 2007**).

Alors que les méthodes chimiques sont effectuées par une variété d'agents chimiques tels que les acides, les bases comme l'ammoniaque et la soude, des agents oxydants tel que le peroxyde d'hydrogène, des agents réducteurs (bisulfites), des agents chlorés et des formaldéhydes sont utilisés pour dégrader ou bio-transformer les mycotoxines (**YIANNIKOURIS & JOUANY, 2002**), de nombreux travaux indiquent l'apparition des résistances des moisissures vis-à-vis de ces substances chimiques, qui causent à la fois des problèmes toxicologiques et écologiques (**BELYAUGOUBI, 2006**). Il est donc important d'orienter la recherche vers des nouvelles méthodes biologiques telles que l'utilisation des micro-organismes capables de dégrader enzymatiquement ou biotransformer les mycotoxines (**CLINQUENT, 2004**); De nombreux travaux confirment la capacité des bactéries lactiques à inhiber le développement des moisissures pathogènes ainsi leurs toxines. **KARUNARATNE et al (1990)**, ont mis en évidence l'inhibition de la croissance d'*Aspergillus flavus*, de la production de toxines en milieu liquide par *Lactobacillus*, et à ce propos, **GOURAMA, 1991**, constata qu'un mélange de *Lactobacillus* spp empêcha la germination des spores d'*Aspergillus flavus*. D'autres méthodes biologiques consistent à l'utilisation des fibres capables d'adsorber et d'immobiliser les mycotoxines dans le tractus gastro-intestinal (**CLINQUANT, 2004**). D'autres méthodes de réduction de la flore fongique et ses toxines prise en compte consiste à l'utilisation des nouvelles substances antifongiques provenant des ressources naturelles notamment les plantes médicinales et aromatiques, plusieurs laboratoires à travers le monde sont orientés vers la recherche de ces substances et leurs valorisations (**DAHOU et al., 2004 ; SUDHAKAR et al., 2008 ; MEZITI, 2009**).

Les plantes ont toujours été une source riche de médicaments parce qu'elles produisent une gamme de molécules bioactives, dont la plupart jouent probablement le rôle de défense chimique contre de prédateurs ou des agents infectieux (**SMALL & CATLING, 2000**), comme métabolites secondaires, les huiles essentielles interviennent dans plusieurs domaines (**OUSSOU et al., 2010**). Ils ont trouvé leur place en aromathérapie, en pharmacie, en parfumerie, en cosmétique et dans la conservation des aliments. Leur utilisation est liée à leurs larges spectres d'activités biologiques reconnues (**ARMARTI et al., 2010**). A titre d'exemple, l'activité antifongique des huiles essentielles d'*inulaviscosa*. Les travaux de **CAFARCHIA et al., 2005** montrent que l'activité antifongique des huiles essentielles des feuilles, des fleurs, de la plante entière et de la plante entière sans fleurs contre les dermatophytes et *Trichphyton mentagraphytes*. La cible principale de cet effet est l'inhibition de la synthèse d'ergostérol et par conséquent, l'inhibition de la synthèse de la chitine constitue de la paroi des dermatophytes (**BENHAMMOU, 2005**).

A côté des antifongiques synthétiques connus, différentes plantes sont caractérisées par la synthèse des substances actives appartenant majoritairement d'une part, aux métabolites secondaires tels les polyphénols, les huiles essentielles, les alcaloïdes, etc. Et d'autre part, aux métabolites primaires telles les huiles fixes (**MEUNIER, 2003**). De nombreux chercheurs ont étudié leurs effets antimicrobiens notamment antifongiques.

L'importance indiscutable des plantes aromatiques, leur contenu et la nature chimique de leurs constituants, leur confèrent de grandes perspectives d'application. Approximativement 20% ont été analysées pour une activité antimicrobienne. Malgré cela, un large spectre de ces composés ont été purifiés et ont démontré des propriétés antifongiques (**DE LUCCA et al., 2005; MARZOUK et al., 2009**).

L'efficacité antifongique de ces substances est essentiellement due à la composition de celles-ci en molécules bioactives variées appartenant à différentes classes chimiques, pouvant être mises à profit pour réduire la flore fongique contaminante (**OURAÏNI et al., 2005**). L'activité antifongique des extraits des plantes a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antifongique de ces extraits. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable, dont on note l'absence de travaux approfondis relatifs à celles-ci.

Quelques investigations sur le mécanisme d'action antifongique des huiles essentielles ou de leurs constituants ont été menées par différents auteurs : **BOOCHIRD & FLEGEL (1982)** ont suggéré que les huiles essentielles auraient des cibles qui dépendent de la concentration en celle-ci qui sont la paroi cellulaire, la membrane cytoplasmique et le cytoplasme. **KURITA et al (1979)** pensaient que l'activité inhibitrice de ces composés serait due à leur affinité avec les groupements SH impliqués dans la division cellulaire.

Le travail proposé vise à évaluer l'effet antifongique des huiles extraites des graines de plantes médicinales très connues au niveau local : *Citrullus colocynthis L.*, *Linium usitatissimum L.* et *Nigella sativa L.*, Il a aussi pour objectif l'incorporation de ces huiles dans un régime alimentaire de rat intoxiqué par des mycotoxines en vue d'étudier l'effet régulateur probable de ces fractions lipidiques.

La pastèque sauvage ou pomme amère *Citrullus colocynthis L.* est une espèce proche de la pastèque, appartenant à la famille de Cucurbitacées (**MARZOUK et al., 2010**). La coloquinte est une plante herbacée. Les tiges sont angulaires et rugueuses, les feuilles sont alternes rugueuses et longues, de 5-10 cm ont un limbe découpé en 5 à 7 lobes séparés par des sinus larges ; le lobe central et parfois ovale ; les fleurs sont monoïques (à sexe séparé) , les fleurs femelles sont aisément distinguées par un ovaire global, velu, inférieur, la corolle jaune comporte cinq lobes, les fruits sont sphériques de 7-10 cm de diamètre, vert avec des raies jaunes ondulées, lisse ayant à maturité la grosseur et la couleur d'un citron, à épicarpe coriace blanchâtre ou jaunâtre et à pulpe blanchâtre très amère contenant des graines de petite taille ovoïdes et aplaties de couleur variante de l'orange au brun noirâtre lisse avec une saveur amère mucilagineuse (**FEINBRUN-DOTHAN 1978 ; FLUCKIGER, 1891**). La coloquinte possède plusieurs noms vernaculaires comme "Hadja, Handal, Hantel, Taberka et Tefersite". On la trouve dans de nombreux pays d'Afrique, du Moyen-Orient et d'Asie (**NEELA & AMITAVA, 1997**).

Les graines de *Citrullus colocynthis* contiennent 26,6 % des huiles 13,5% des protéines, 2,1 des cendres, 59,9 % des fibres brutes, 4,9 % d'azote libre et contient 322mg/100g de potassium, 119mg/100g de phosphore et 3,3 mg/100g de fer (**SAWAYA et al., 1986**). Contiennent aussi la phytosteroline (ipurand), 2 phytostérols, 2 hydrocarbures, saponines, alcaloïdes, polysaccharides, glucosides, et des tannins (**DUKE, 1978**). Les travaux réalisés sur la composition chimique des graines sèches (Tableau 2.1) de la coloquinte du nord de l'Arabie Saudi (Najd) en 1990 ont montré

que les graines contiennent 17,5 % des protéines et 43,1% des fibres (BHATTACHARYA, 1990). Le criblage phytochimique de la plante à montré la présence d'une grande quantité de composés phénoliques et des flavonoïdes (KUMARI et al., 2008).

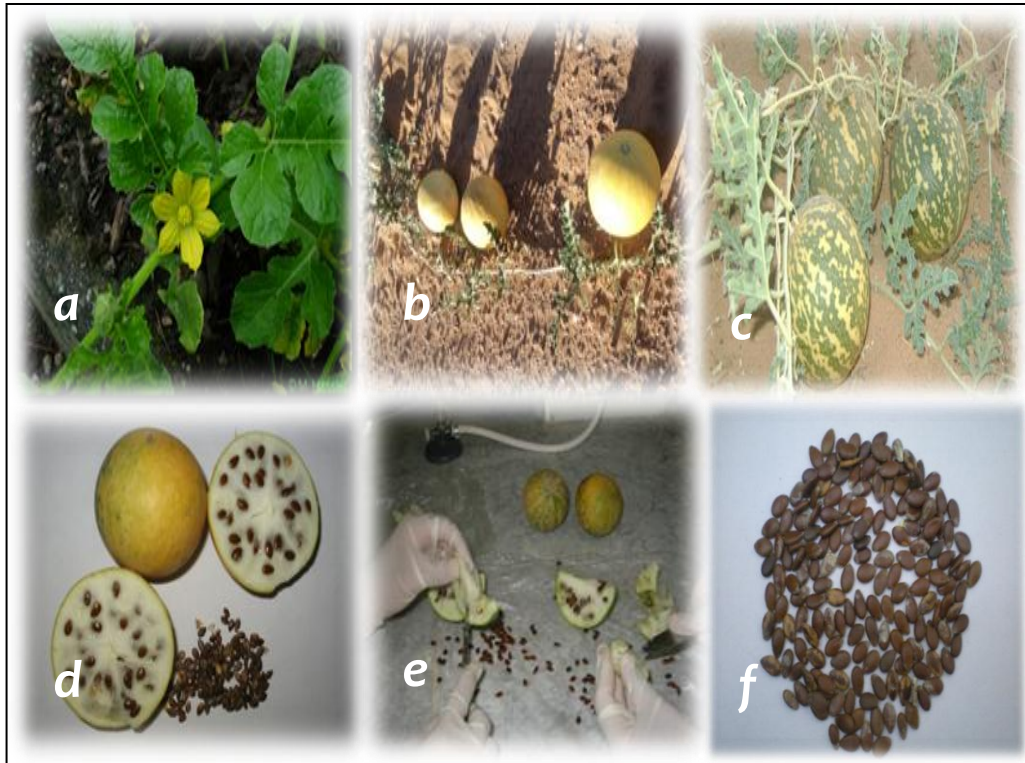


Figure 1.1 *Citrullus colocynthis* L.

a : fleur du *Citrullus colocynthis* ; **b,c** : la plante dans sa nature ; **d,e** : fruit décortiqué
f : graines (GOOGLE, 2012)

Tableau 1.1 Composition chimique des graines (BHATTACHARYA, 1990).

Composants	Pourcentage (%)
Matière organique	92,5
Taux de protéines	17,5
Fibres	43,1
Calcium	0,12
Phosphore	0,46
Magnésium	0,26
zinc	0,0026

Cette cucurbitacée est largement utilisée dans la médecine traditionnelle (**MARZOUK & al., 2009**) pour le traitement de nombreuses maladies telles que le rhumatisme, l'hypertension artérielle et de diverses maladies contagieuses, y compris dermatologiques, problèmes et gynécologiques, urinaires et les infections pulmonaires. La fraction lipidique de la plante a fait l'objet de plusieurs recherches. Elle contient des huiles volatiles, des acides gras. D'après les travaux de **YANIV et al (1999)** (Tableau 2.2) sur la coloquinte d'Israël ; les graines de la coloquinte contiennent entre 17 et 19, 5 % d'huile dont l'acide gras majoritaire c'est l'acide oléique entre 11,7 et 15 % et l'acide linoléique entre 66 et 77 %.

Tableau 1.2 Fractions lipidiques des graines (**YANIV et al., 1999**).

Acides gras	Pourcentage %
L'acide oléique C18 :1	11.7-15
L'acide linoléique C18 :2	66-70
L'acide linoléique C18 :3	Traces
L'acide palmitique C16 :0	8.6-12

Le lin (*L. usitatissimum*) est une espèce de la famille des *Linacées* (**EL-NAGDY et al., 2010**). Le nom botanique, *Linum usitatissimum* a été donné par Linné dans son livre «Species Plantarum» (**LINNAEUS, 1857**). C'est une plante herbacée annuelle (**JHALA, 2010**) dressé (**COSÇKUNER et al., 2006**), avec un système racinaire superficiel (**FERNALD, 1950**). Le *L. usitatissimum* L. a une courte racine pivotante émettant des racelles fibreuses pouvant atteindre 90 à 120 cm en sol léger. Les feuilles sont simples, sessiles, linéaires-lancéolées, entières, portées sur la tige et ses ramifications. L'inflorescence est une cyme ou grappe terminale lâche (**ACIA, 1994**). Les fleurs bleues vives atteignant près de 3 cm de diamètre, hermaphrodites et hypogynes, ont un pédoncule dressé et allongé, 5 sépales, 5 pétales (bleues), 5 étamines et un pistil formé de 5 carpelles séparés par autant de fausses cloisons. Le fruit, une capsule à cinq loges, contient un maximum de 10 graines. La graine est ovale, lenticulaire, longue de 4 à 6 mm, avec une surface lisse et luisante de couleur brune moyen à pâle. La graine contient de 35 % à 45 % d'huile et de 20 % à 25 % de protéine (**GILL, 1987; FERNALD, 1950**).

Le lin, *Linum usitatissimum* L. est l'une des plus anciennes plantes cultivées. Les civilisations les plus reculées utilisaient cette plante et connaissaient les vertus médicinales des graines. Les capsules de fruits sphériques contenant deux graines dans chacun des cinq compartiments. La graine elle-même est plate et ovale avec un pointu un peu plus grand qu'une graine de sésame et une surface lisse, brillante. Les graines de *Linum usitatissimum* L. ont une couleur moyenne, brun rouge à un jaune clair. La couleur des semences est déterminée par la quantité de pigment dans la graine externe enduite le plus de pigment, le plus sombre de la graine. Les dimensions de la graine varient de 3,0 à 6,4 mm environ dans longueur, 1,8 à 3.4 mm de largeur et 0,5 à 1,6 mm d'épaisseur (FREEMAN, 1995).

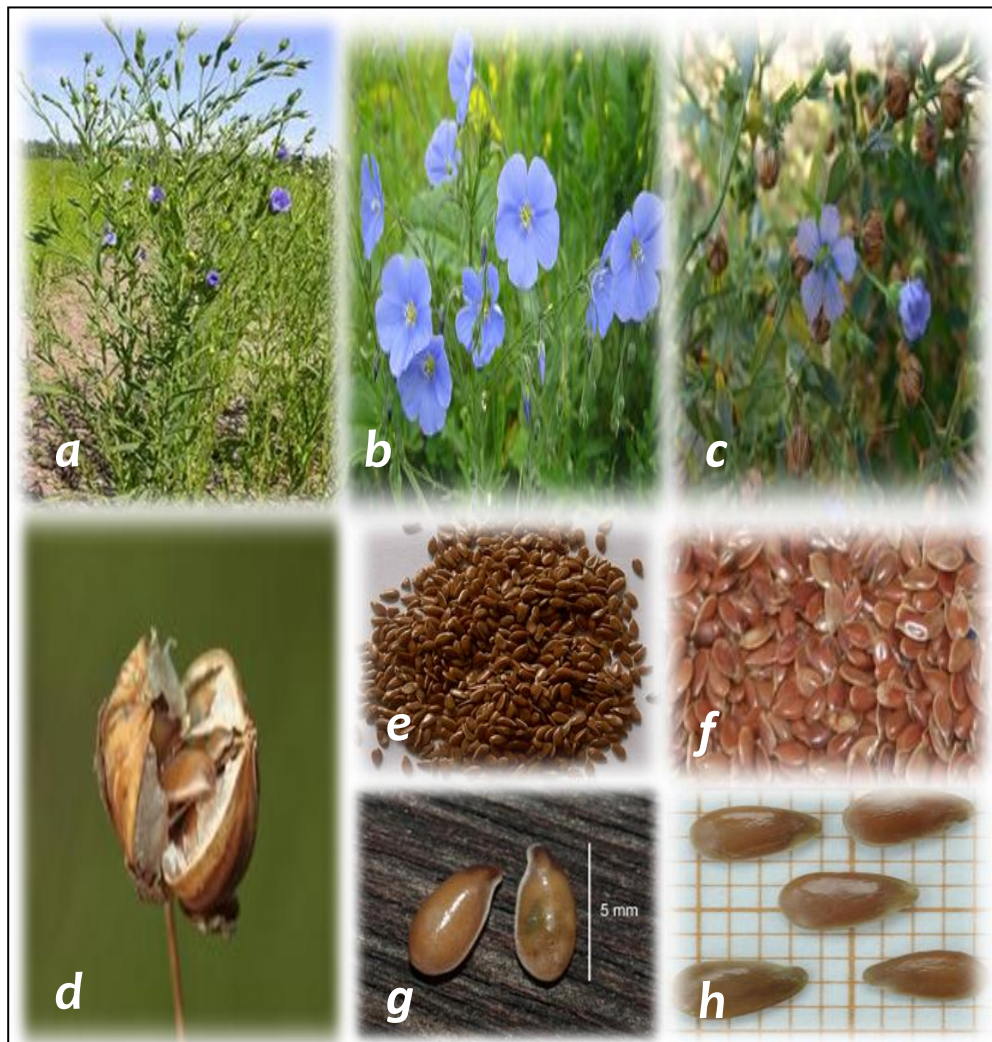


Figure 1.2 *Linum usitatissimum* L.

a : plante de *L.usitatissimum* ; **b,c** : fleur et fruit de la plante; **d** : gousse décortiquée
e,f, g,h : graines de *L.usitatissimum* (GOOGLE, 2012)

Généralement, les graines de lin huileuses ont une grande dimension que les graines de lin fibre (**GREEN & MARSHALL, 1981**). Les graines ont une texture croquante et moelleuse et un agréable goût de noisette (**CARTER, 1993 ; COSÇKUNER et al.,2006**).

Le lin est riche en graisses, protéines et fibres alimentaires. L'analyse chimique des graines de *Linum usitatissimum* montre une moyenne 30-40 % de matière grasse, 20-25 % de protéines, 20-28 % de fibres alimentaires, de l'humidité 4-8 % et 3-4 % cendres, et l'huile contient des vitamines A, B, D et E, des minéraux, et des acides aminés (Tableau 2.3). La composition des graines de *Linum usitatissimum* L. peut varier avec la génétique, l'environnement de plus en plus, le traitement de semences et méthode d'analyse. Généralement, la teneur en protéines de la diminution des semences que les augmentations de la teneur en huile (**BHATTY, 1997; CARTER, 1993 ; CUNNANE et al., 1993 ; OOMAH & MAZZA, 1997**). Les graines de lin contiennent également des quantités importantes (5-8%) des fibres solubles matériel, mucilagineux et il a une haute capacité de rétention et montre des propriétés fonctionnelles similaires à celles de la gomme arabique (**KENASCHUK & MAZZA, 1996 ; REBOLE et al., 2002 ; COSÇKUNER et al.,2006**).

Le Lin (*Linum usitatissimum*) a été utilisé pendant des siècles comme une source pour l'extraction du pétrole. Ces dernières années, il a suscité un intérêt considérable à la suite d'études qui attribuent des avantages potentiels pour la santé de ses composants, y compris la prévention des maladies, chroniques non transmissibles. Parmi ces composés présentant une activité biologique, l'acide alphalinoléique, les lignanes et les fibres solubles sont d'un intérêt particulier (**GUTIERREZ, 2010**) (Tableau 2.4). Ces composés sont revendiqués pour la réduction du risque des maladies cardio-vasculaires, dans l'inhibition du développement du diabète (**WESTCOTT & MUIR, 2003**), pour leurs propriétés antioxydantes, l'activité oestrogènes et des propriétés anti-œstrogènes (**HALL et al., 2006 ; MUELLER et al., 2010**).

Le lin a été aujourd'hui principalement cultivé pour son huile (**BERGLUND, 2002; OOMAH, 2001**) L'huile de lin offre également d'importants avantages nutritionnels en raison du leur niveau élevé de oméga-3 acides gras. L'expérimentation animale et des études cliniques indiquent que l'intervention des acides gras oméga-3 a des propriétés anti-inflammatoires, et, par conséquent, pourraient être utiles dans la gestion des maladies inflammatoires et auto-immunes, y compris maladie coronarienne, la dépression majeure, le vieillissement, l'arthrite rhumatoïde, la maladie de Crohn et le cancer (**SIMOPOULOS, 2002 ; STAM, 2006**).

Tableau 1.3 Principales caractéristiques de la graine de *Linum usitatissimum*
(Acikgoz et al., 2008)

Caractéristiques	Graines de lin
Huile ^a %	42.2
Cellulose (%)	14.1
Protéine ^a (%)	14.4
Humidité	6.7
Volatiles	77.0
Carbone fixe	10.7
Ash	5.6
Carbone	61.0
Hydrogène	8.5
Nitrogène	2.3
Oxygène	28.2
Formule brute	CH _{1.67} O _{0.35} N _{0.03}
H / C rapport molaire	1.67
O / C rapport molaire	0.35
Pouvoir calorifique (kcal / kg)	6700

Tableau 1.4 Fractions lipidiques des graines

Acides	Acide gras	Pourcentage %	Références
Acide palmitique	16 :0	5.3	(STAM, 2006)
Acide stéarique	18 :0	3.1	(STAM, 2006)
Acide oléique	18 :1	16.2	(STAM, 2006)
Acide linoléique	18 :2	14.7	(STAM, 2006)
Acide linoléique	18 :3	59.6	(STAM, 2006)
Acide Arachidique	20	0.5	(SPENCER, 2002)
Autres	/	0.2	(SPENCER, 2002)

Nigella sativa L. est une plante herbacée appartenant à la famille des Renonculacées (GUIGNARD, 2001). C'est une herbe originaire du moyen orient, de l'Europe centrale et de l'ouest de l'Asie, elle est maintenant cultivée dans plusieurs régions du monde surtout dans le bassin méditerranéen et en Inde. Elle se développe sur les terres semis arides au sein de communautés naturelles où prédominent les thérophytes (ANTUONO & HAMAZA., 2002 ; BADARY et al., 2003 ; MEZITI, 2009). *Nigella sativa* est une plante annuelle herbacée atteignant 30 à 60 cm de haut. Les feuilles pennatiséquées, divisées en lobes étroits, elles sont lancéolées à linéaires et présentent des onglets nectarifères, les feuilles inférieures sont petites et pétaloïdes et les supérieures sont longues (BONNIER, 1990 ; GHEDIRA, 2006). Les fleurs sont petites à pétales blanchâtres et sépales pétaloïdes et présentent de nombreuses étamines insérées sur le réceptacle (GHEDIRA, 2006). La plante est hermaphrodite à reproduction autonome dont le fruit est une capsule formée de 3 à 6 carpelles soudés entre eux jusqu'à la base des styles persistants (BONNIER, 1990). Chaque capsule contient plusieurs graines triangulaires blanchâtres et à maturité, elles s'ouvrent et l'exposition des graines à l'air les rend noire, ses graines sont ovoïdes de 2 à 3.5 mm présentent 3 à 4 angles avec une face supérieure finement granuleuse et réticulée (GHEDIRA, 2006).

En fait, cette plante a occupé une place spéciale pour son grand spectre d'application médicale dans la civilisation islamique, dû au proverbe du **Prophète MOHAMED** (salut et miséricorde soit sur lui); « El habbah sauda est un médicament pour toutes les maladies sauf la mort », ces paroles sont restées pour longtemps un mystère pour la science jusqu'à l'arrivée des techniques modernes qui ont réussi à prouver les vertus thérapeutiques des graines de cette plante.

La nigelle possède trois noms latins *Cuminum nigrum*, *N. indica* et *N. sativa*, ce dernier étant le plus employé. Ce sont des noms dérivés du latin "*Niger*" qui signifie noir. *N. sativa* possède aussi une multitude de noms à travers le monde, Sinouj, Sanouz, Shunez, Habbah sauda, Habbet el beraka, Kamun aswad (Arabique), Shoushma (Arménienne), Zwiebelsame , Schwarzkümmel (Allemande), Devil in the bush, Love in the mist, Fennel flower, Onion seed (Anglaise), Mustköömen (Estonienne), Neidonkuka (Finlandaise), Cheveux de vénus, Nigelle, Poivrette (Française) (GHEDIRA, 2010).



Figure 1.3 *Nigella sativa* L.

a : plante de *N.sativa* ; **b,c** : fleurs et fruit de la plante ; **d** : gousse de graines
e,f : graines de *N.sativa*. (GOOGLE, 2012)

Les graines sont très riches et diversifiées dans ses compositions chimiques. Ils contiennent des aminoacides, protéines, glucides, et huiles volatiles (KHAN, 1999). Les graines *N.sativa* renferment environ 0,4 – 0,45 % d’huile essentielle, plus de 30 % d’huiles fixes (DOMINICZAK et al., 1991 ; HASHEM & EL-KIEY, 1982) (EL-ALFY et al., 1975 ; HASHEM & EL-KIEY, 1962) et 38% de lipides totaux (MARTIN et al., 2001), avec 85% du total des acides gras insaturés (HOUGHTON et al., 1995). Les acides oléique et linoléique sont les deux importants et principaux acides gras de l’huile de *N. sativa* (HOUGHTON et al., 1995 ; BURITS & BUCAR, 2000; EL-DAKHAKNY et al., 2000 ; ZAOUÏ et al., 2002 ; NICKAVAR et al., 2003 ; ALI & BLUNDEN, 2003). Ils constituent 75,2 % des acides gras totaux (ABDEL-AAL & ATTIA, 1993). D’autres auteurs fournissent des valeurs

différentes : les graines contiendraient 26,6% d'huiles dont 64,6 % d'acide linoléique et 20,4 % d'acide palmitique (SENER et al., 1985).

Nigella sativa ou Cumin noir est l'une des épices couramment utilisées dans les préparations alimentaires. Il est également utilisé en médecine traditionnelle comme un stimulant, carminatif, et un astringent. Plusieurs effets thérapeutiques, y compris l'effet sur l'asthme et dyspnée ont été décrits pour les graines de *Nigella sativa* en Iraniens anciens livres de médecine (AVE-SINA, 1990). Par conséquent, le cumin noir a été largement étudié pour sa valeur nutritive et ses activités biologiques.

Les huiles de *Nigella sativa* contiendraient approximativement 46% de monoterpènes et 25 % de composés carbonyles dont 24,5 % de thymoquinone, 1,7 % de phénol, 0,9 % d'alcools et 16 % d'esters (ABOUTABL & COLL., 1986) (Tableau 2.5). L'analyse chimique d'échantillons d'huile fixe de *Nigella sativa* de différents pays ont montré que les huiles sont très similaires dans la composition, avec 85 % du total en acides gras insaturés (HOUGHTON et al., 1995).

Tableau 1.5 Composition chimique de l'huile de *Nigella Sativa*
(MAHMOUD et al., 2002 ; NICKAVAR, 2003)

Acides gras	Pourcentage
Acide l'aurique	0.6
Acide myristique	0.5
Acide palmitique	12.5
Acide stéarique	3.4
Acide oléique	23.4
Acide linoléique	55.6
Acide linoléique	0.4
Eicosadiénoïque acide	3.1

D'autres études montrent que les huiles fixes contiendraient 0,17 % de thymoquinone et de nombreux acides gras dont la composition varie peu selon l'origine des échantillons. L'huile fixe de *Nigella sativa* possède une importante action antinociceptive qui est due à la présence d'un principe opioïde. Cette action est antagonisée par la naloxone. Des études plus approfondies ont démontré que l'action antinociceptive peut être également engendrée par la thymoquinone aussi

bien que l'huile fixe par activation indirecte des récepteurs superspinax μ et k (**ABDEL-FATTAH et al., 2000 ; ALI & BLUNDEN, 2003**). L'huile fixe et ses fractions (lipides neutres, glycolipides et phospholipide) ont montré une activité antioxydante vis-à-vis des deux radicaux libres stables (DPPH et le radical glavinoyl). Cette activité antioxydante est corrélée avec la teneur en acides gras polyinsaturés, en composés insaponifiables et en phospholipides, de même que la valeur peroxyde initiale de l'huile (**RAMADAN & MÖRSEL, 2003**). L'huile fixe de *Nigella sativa* inhibe la peroxydation lipidique non enzymatique dans les liposomes (**HOUGHTON et al., 1995**).

Tableau 1.6 Quelques travaux antérieurs sur *Citrullus colocynthis* L.

Fraction de la coloquinte	Utilisation	Références
Les graines	Des applications alimentaires et non alimentaires pour compléter ou remplacer une partie des huiles conventionnelles.	Imededdine Arbi Nehdi et al., 2013
	Propriétés antioxydantes	Jing MIAO et al., 2012
	contre lignée cellulaire d'hépatome contre carcinome d'Ehrlich ascite	Seif-Eldin N. Ayyad et al., 2013
	activités antibactérienne et anti- <i>Candida</i> Antidiabétique, effet insulino-stimulant Traiter des scabes de chameau et autre anderythema d'infections de peau chez les animaux domestiques et l'homme	B. Marzouk et al., 2010 N. Sebbagh et al., 2009 ; Nmila et al., 2002 Habs et al., 1984
Les racines	Activités antioxydants et activités de chiffonnage Traitement de l'ictère	Abdullah I. Hussain. et al., 2013
	Les maladies urinaires	Nadkan., 1998 ;Burkill.,1985
	Les rhumatismes	Dafni et al., 1984
	Activités anti-inflammatoires et anti-analgésiques	Marzouk et al., 2009
Les fruits	Activités antioxydants et activités de chiffonnage	Abdullah I. Hussain. et al., 2013
	Contre lignée cellulaire d'hépatome	Seif-Eldin N. Ayyad et al., 2013
	Contre carcinome d'Ehrlich ascite	Mahmoodi Mehdi et al., .2011
	effet insulino-stimulant	Belsem Marzouk et al., 2010
	la polyarthrite rhumatoïde	B. Marzouk et al., 2010
	Activités analgésiques et anti-inflammatoires	Dan Schafferman et al., 1984 ; Bruneton., 2005 ; Dane et al., 2007
Activités antibactérienne et anti- <i>Candida</i> Contre douleur d'estomac <i>Hypoglycémiant</i>	Baba aissa., 2000 ; Sebbagh et al., 2008	
La pulpe	Laxatif violent	Dafni et al., 1984 ; Burkill 1985
	Remède contre les infections de la peau	Dane et al., 2007
	hydragogue efficace et cathartique	
Les feuilles	Activités antioxydants et activités de chiffonnage	Abdullah I. Hussain. et al., 2013
	Contre l'hémorragie, l'eczéma et les douleurs d'articulation	Halimi., 2004

Tableau 1.7 Quelques travaux antérieurs sur *Nigella sativa* L.

Utilisation	Références
le domaine de l'allergie	P. Gelot et al., 2012
activité antibactérienne et des activités cytotoxiques	Hanene JrahHarzallah et al., 2011
inhibiteur de la lipase et la glucosidasepancreatique	B. Khettal,et al., 2011
traitements antioxydants dans la prévention de la toxicité	Nahed S et al., 2011
activités antioxydante et antimutagènesdes parties aériennes et des racines de <i>Nigellasativa</i>	Soumaya Bourgou et al., 2008 ; Meziti, 2009
Activité antidiabétique	Al'awadi, 1991 ; Al-Hader et al.,1993 ;El-Shabrawy et Nada,.1996 ; Altan et al.,2007
Le traitement des désordres gastro-intestinaux	Meziti,2009
Activité analgésique et anti-inflammatoire d'extraits ou de composés purs issus de <i>Nigellasativa</i>	(Khanna et al.,1993),(Houghton et al.,1995 ;Mutabagani et El-Mahdy,1997),(Al-Ghamidi,2001),(Al-Naggar et al 2003 ;Thabrew et al.,2003)
Activité antimicrobienne sur des germes Gram positif et Gram négatif	(Hanafy et Hatem,1991 ;Aboul-Ela et al.,1996),(Agrawal et al.,1979 ;Aljabre et al.,2005
Antiviraux	(Ferdous et al.,1992),(El-Kamali et al.,1998 ;Mouhajir et al 1999),(Salem et Hossain,2000)
L'huile fixe présente également une excellente activité antifongique, notamment sur <i>A.niger</i>	Agrawal et al.,1979
Immuno-potentialisatrices des lymphocytes T humains	(El-Kadi et al.,1987 ;Haq et al.,1995 ; Sawmy et Tan, 2000),(Houghton et al.,1995 ; Ali et Blundes ,2003)
Effet sur le système respiratoire	Mezziti,2009
Effet anticancéreux	(Hassan et El-Dkhakhny,1992 ;Worthen et al.,1998),(Salim et Fukushima.,2003)
Propriétés antitumorales	(Nair et al.,1991 ;Salomi et al.,1992 ;El-Daly,1998),(Worthen et al.,1998),(David et al.,1998),(Awad,2005)
Hypotensive	(El-Tahir et al.,1993),(Houghton et al.,1995 ;Burits et Bucar,2000 ;E-Dakhakhny et al.,2002 ;Zaoui et al.,2002 ;Nickavar et al.,2003 ;All et Bluden,2003),(Zaoui et al,2000)
Anticestodeantinematod	Akhtar et Riffat,1991,Mahmoud et al.,2002, Ghedora,2006 ;Ait Mbarek et al.,2007
Antilcérogène	Akhtar et al.,1996 ;El-Dakhakhny et al.,2002 ;Raj Kapoor et al.,2002
Actions antihpatotoxique et antinphrotoxique	Ghedira,2006

Tableau 1.8 Quelques travaux antérieurs sur *Linum usitatissimum* L.

Fraction de lin	Utilisation	Références
La plante	Un rôle important dans la réduction de l'extensibilité de la paroi cellulaire dans des conditions de stress.	Maryam Dahajipour Heidar abadi et al, 2011
	Phytoremédiation potentiel et l'activité de synthasephytochélatine	L. Havel et al, 2010
	Dépistage de la capacité génétiquement base à accumuler et / ou de tolérer des métaux	Iva Smykalova et al, 2010
	Ingrédient alimentaire et la production d'additifs alimentaires	Klaus Mueller et al ,2010
	Le cancer du sein et le cancer du prostate	Hutchins et al, 2000 ;Zhaoet al2004,2007 ;Thompson et al 2005
Graines entières ou broyées	Reduction du cholesterol total et du cholesterol LDL	Patterson, 2008
	Reduction de la reponse glycémique post-prandiale	
	Diminution de l'inflammation et du risque de cancer	
	L'effet contre l'hyperglycémie	Arvindkumar E Ghule et al,. 2012
	Source partielle des protéines et une source exclusive de lipides et de fibres dans le développement du système nerveux central.	FlaviaSpreaficoFernandes,et al,. 2011
Graines entières ou broyées	Rôle rénoprotecteurs ,effetanti-hypertenseur et la conservation des enzymes d'oxydation biologique.	Arvindkumar E. Ghuleet al,. 2011
	Contre les maladies cardiovasculaires et le cancer	Martha Verghese et al,. 2011 ;Bloedo, et Szapary,2004
	Abaisse de la pression artérielle	
	Antioxydants et diminue les lipides sanguins et de l'inflammation	Paschos et al,.2007
	Syndrome du côlon irritable et de malaise de l'estomac général	Bhathena et al,.2002 ;Prasad,1997 Blumenthal et al,.2000
Fibres solubles	Réduction de la cholestérolémie et de la glycémie	Patterson, 2008
Fibre insolubles	Réduction de la fonction intestinale	

Acide alphalinoléique (ALA)	Réduction de la cholestérolémie et des concentrations de biomarqueurs inflammatoires Réduction de risque de coronaropathie, d'accidents vasculaires cérébraux et de cancer Traitement de l'hypertrophie de la prostate Prévention du cancer (du côlon, du poumon et leucémie) Maitrise de la néphropathie lupique (insuffisance rénal)	Patterson, 2008
Lignanes (SDG)	Régénération des pousses d'explants Anti-tumorale podophyllotoxine (ptox) Développement d'anticorps contre sécoisolaricirésinol Réduction des risques liés aux maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, à la polyarthrite rhumatoïdes et au diabète Effet antitumorigène sur certains cancers Effet hypocholestérolémiants	BehrouzAlizadeh et al, 2012 Sedigheh Esmaeilzadeh Bahabadi et al, . 2012 Jacques Attoumbré et al, 2010 Patterson, 2008

Le travail proposé vise à évaluer l'effet antifongique des huiles extraites des graines de plantes médicinales très connues au niveau local : *Citrullus colocynthis L.*, *Linium usitatissimum L.* et *Nigella sativa L.*, Il a aussi pour objectif l'incorporation de ces huiles dans un régime alimentaire de rat intoxiqué par des mycotoxines en vue d'étudier l'effet régulateur probable de ces fractions lipidiques.






De ce fait, le présent travail a pour objectifs :

- Etude physicochimique de ces huiles, séparation du composé majoritaire et sa caractérisation par analyses spectrales (CPG SM – H¹RMN –C¹³ RMN- IR).
- Evaluation de l'activité antifongique des huiles extraites à partir des graines des plantes médicinales sur des souches *Aspergillus* toxigènes. (Effets antifongique de l'huile brute).





- Evaluation antifongique des esters majoritaires de ces huiles sur ces champignons.
- Etude et mises en évidence des éventuelles effets régulateurs des ces fractions huileuses *in vivo* sur des modèles expérimentaux intoxiqués par des aflatoxines et des ochratoxines,
- Détermination des effets de ces régimes avec les différentes huiles sur l'évolution pondérale et sur la consommation alimentaire journalière ainsi que les paramètres biochimiques du sang et des urines.

A cet effet deux groupes de rats wistar ont été étudiés :

Groupe 1, constitué de cinq lots de rats (n=5) :

-  **Lot RI** reçoit un régime témoin à base d'huile de tournesol à 4% et l'eau de source à *libitum*.
-  **Lot RII** reçoit un régime témoin à base d'huile de coloquinte à 4% et l'eau de source à *libitum*.
-  **Lot RIII** reçoit un régime témoin à base d'huile de nigelle à 4% et l'eau de source à *libitum*.
-  **Lot RIV** reçoit un régime contaminé par l'OTA (250µg /Kg d'aliment) et l'eau de source à *libitum*.
-  **Lot RV** reçoit un régime contaminé par l'AFB₁ (120µg /Kg d'aliment) et l'eau de source à *libitum*.

Groupe 2, constitué de quatre lots de rats (n=5) :

-  **Lot RVI** reçoit un régime contaminé d'OTA (250µg /Kg d'aliment) à base d'huile de coloquinte à 4% et l'eau de source à *libitum*.
-  **Lot RVII** reçoit un régime contaminé d'OTA (250µg /Kg d'aliment) à base d'huile de nigelle à 4% et l'eau de source à *libitum*.
-  **Lot RVIII** reçoit un régime contaminé d'AFB₁ (120µg /Kg d'aliment) à base d'huile de coloquinte à 4% et l'eau de source à *libitum*.
-  **Lot RIX** reçoit un régime contaminé d'AFB₁ (120µg /Kg d'aliment) à base d'huile de nigelle à 4% et l'eau de source à *libitum*.

Chapitre 2

Matériels Et Méthodes

2.1 Récolte du matériel végétal

Notre étude s'est attelée à l'investigation sur l'activité antifongique des trois huiles de graines de *Citrullus colocynthis*, *Nigella sativa* et *Linum usitatissimum*.

Les fruits *Citrullus colocynthis* (Coloquinte) en phase de maturation et de sénescence totale ont été récoltés aux alentours de la ville de Béni abbés (240 km Sud du chef-lieu de la wilaya) et de la région dite **Sefisefa** (Nord de la wilaya de Béchar).

Les graines de *Nigella sativa* et *Linum usitatissimum* ont été achetées au niveau du marché local de la wilaya de Béchar.



Figure 2.1 Carte géographiques des zones de prélèvement (Google Earth 2011).

2.1.1 Séchage des graines

Les graines ont été nettoyées et débarrassées des débris, ensuite étalées sur du papier en fines couches, retournées fréquemment, et laissées séchées au laboratoire - pièce aérée - à température ambiante pendant deux à trois semaines. Après ce temps, le matériel végétal sec est ensuite conservé dans des récipients hermétiquement fermés en attendant son utilisation.

2.1.1 Extraction des huiles NF V 03-905

L'extraction de l'huile a été réalisée par un extracteur soxhlet avec un solvant polaire (éther de pétrole 95%) sur une matrice solide qui est le broyat des graines.

Les graines séchées sont broyées dans un broyeur à mortier type **Retsch RS100** ; 15 grammes de broyat sont pesés dans une cartouche d'extraction bouchée avec du coton dégraissée et disposée dans l'appareil d'extraction. La quantité totale du solvant ajoutée doit être d'une et demi à deux fois la capacité du réservoir à siphon d'extraction de l'appareil. L'avantage dans ce procédé est que le solvant condensé s'accumule dans un réservoir à siphon, ce qui augmente la durée de contact entre le solvant et le produit à extraire. Quand le solvant atteint un certain niveau, il amorce le siphon et retourne dans le ballon en entraînant la substance dissoute (**HAIDARA, 1996**). Les extractions se sont déroulées sur une durée de 6 heures et les rendements sont exprimés en pourcentage par rapport à la matière initiale après pesée d'un ballon, préalablement taré, ayant subi une évaporation du solvant. Le rendement est calculé par la formule suivante :

$$Rdt = \frac{m_0}{m_1} \times 100$$

Où :

m₀ : Masse en grammes de l'huile évaporée

m₁ : Masse en grammes de la prise d'essai (les graines broyées)

2.2 Caractérisation physicochimique des huiles

2.2.1 Caractéristiques physiques

2.2.1.1 Densité relative à 20°C (NF ISO 6883)

La densité relative d'une huile est le rapport de la masse d'un certain volume d'huile à 20 °C à la masse d'un volume égal d'eau distillée à 20 °C. La densité relative est mesurée par une suite de pesées à l'aide d'un pycnomètre.

Après nettoyage et séchage du pycnomètre, il a été pesé et rempli d'eau distillée récemment bouillie et refroidie puis plongé dans un bain d'eau jusqu'à ce que l'eau atteigne une température de 20 °C.

Le pycnomètre a été retiré, essuyé extérieurement et pesé.

La même procédure est suivie pour l'huile en remplissant le pycnomètre par le même volume d'huile puis placé dans le bain d'eau pour qu'elle atteigne les 20°C ensuite, le pycnomètre est essuyé et pesé.

La densité relative se détermine :

$$D_{20} = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0}$$

m₀ : Masse du pycnomètre vide,

m₁ : Masse du pycnomètre rempli d'eau distillée,

m₂ : Masse du pycnomètre rempli d'huile.

2.2.1.2 Indice de réfraction à 20°C (ISO 6320)

L'indice de réfraction est mesuré à l'aide de réfractomètre, de type Abbe, thermostaté. Il est lié à la température. Il est mesuré à 20 °C pour les huiles fluides et à 40 °C pour les graisses (OLLE, 2002).

Cet indice est déterminé à l'aide d'une lampe à vapeur de sodium, à la longueur d'onde de 589 nm et à 20°C.

L'indice de réfraction des huiles varie en fonction de leurs insaturations. L'indice de réfraction croît avec le degré d'insaturation des acides gras contenus dans les matières grasses. Il permet de différencier l'appartenance du corps gras aux deux groupes suivants :

- Graisses lauriques végétales (R =1,448 à 1,458) ou animales (R=1,471 à 1,458)
- Huiles végétales (R =1,468 à 1,490) ou animales (R=1,471 à 1,485)

Cependant, il autorise le suivi des opérations d'hydrogénation et de fractionnement des corps gras (ADRIAN *et al.*, 1998).

La surface du prisme du réfractomètre est nettoyée et essuyée avec du papier Joseph et, après étalonnage avec de l'eau distillée à 20°C, quelques gouttes d'huiles de coloquinte sont déposées sur le prisme. La fenêtre de lecture donne directement la valeur de l'indice de réfraction à la température « t° » en degré Celsius. Afin de ramener la valeur de cet indice de réfraction mesuré pour un liquide à une température t, à la valeur référencée à T=20 °C, on peut utiliser une relation affine valable pour de faibles écarts de température :

Si la différence entre la température de mesurage t et la température de référence T est inférieure à 3°C, l'indice de réfraction N_{Dt} à la température de référence T est donnée par la formule :

a) Si $t > T$ $N_{Dt} = N_{Dt} + (t-T) \times F$

b) Si $t < T$ $N_{Dt} = N_{Dt} + (T-t) \times F$

t : Température de la détermination

T : Température de référence qui est 20°C pour les huiles.

F : Facteur de correction, fonction de la température, égal à 0.00035 pour T= 20°C (huiles);

N_{Dt} : Indice de réfraction pris sur le réfractomètre.

2.2.1.3 Point de congélation (NF T 75-102)

Le point de congélation d'une huile est la température constante ou maximale observée pendant la phase de libération de la chaleur latente de solidification lorsque celle-ci à l'état liquide est refroidie.

Un tube à essai contenant 2 ml d'huile accompagnée d'un thermomètre est placé dans un autre tube vide, les deux tubes sont placés simultanément dans un récipient contenant de l'eau et de la glace fondante, le dispositif est en suite placé dans un congélateur.

Lors de l'apparition des premiers cristaux dans l'huile, on note la température de congélation.

2.2.2 Caractéristiques chimiques

2.2.2.1 Etude de l'altération

a. Indice d'acide (NF EN ISO 660)

L'hydrolyse des corps gras, qu'elle soit d'origine chimique (présence d'eau) ou enzymatique par les enzymes lipolytiques (palme, karité, olive) entraîne la formation d'acides gras libres.

L'acidité oléique d'une huile représente le pourcentage des acides gras libres (=FFA pour *free fatty acids*) exprimé conventionnellement en acide oléique pour les huiles végétales (OLLE, 2002).

Il s'exprime par le nombre de mg d'hydroxyde de potassium nécessaire pour neutraliser l'acidité grasse présente dans 1 g de lipides (ADRIAN *et al.*, 1998). Cet indice indique le degré d'altération des esters (essentiellement des triglycérides) présents dans le corps gras. Après avoir pesé exactement 0,5 g d'huile dans un erlenmeyer de 250 ml. On les dissout avec 100 ml d'éthanol 95% /oxyde d'éthyle (50-50 v/v). On dose avec une solution de KOH éthanolique de normalité 0,5 N après avoir ajouté 2 à 3 gouttes de phénolphthaléine jusqu'à coloration rose persistante.

Pour les calculs :

$$\text{Acidité (\%)} = \frac{V \times C \times M}{10 \times m}$$

$$\text{IA (\%)} = \frac{56.1 \times V \times C}{m}$$

56,1: Masse molaire (g/moles) de l'hydroxyde de potassium,

V : Volume (ml) d'hydroxyde de potassium utilisé,

C : Concentration moles/ litre, de la solution titrée d'hydroxyde de potassium utilisée,

m : Masse en grammes de la prise d'essai.

M : 282 pour l'acide oléique.

b. Indice de peroxyde (NF T 60-220 et ISO 3960)

L'indice de peroxyde (encore appelé indice de *Léa*) est recherché pour évaluer l'état de conservation d'une matière grasse au cours du stockage. En effet, les corps gras peuvent s'oxyder en présence d'oxygène et de certains facteurs favorisant (UV, eau, enzyme, trace de métaux, etc.) (CHEFTEL *et al.*, 1984).

Les premiers composés formés au cours de l'oxydation sont les peroxydes ou les hydroperoxydes. Ceux-ci vont ensuite évoluer vers des composés plus stables : aldéhydes, cétones, acides.

L'indice de peroxyde est le nombre de microgrammes d'oxygène actif contenus dans un gramme de corps gras et susceptibles d'oxyder l'iodure de potassium. Il est exprimé en microgrammes par gramme ou plus souvent en milliéquivalent d'oxygène actif par kilogramme. Cet indice permet d'apprécier les premières étapes d'une détérioration oxydative de l'huile (OLLE, 2002).

Environ 5 g de matière grasse sont dissous dans 10 ml de chloroforme, 15 ml d'acide acétique et 1 ml d'iodure de potassium saturé. L'eren contenant ce mélange est fermé avec un bouchon et laissé pendant exactement 5 minutes à l'abri de la lumière.

L'iode libéré est titré avec une solution de thiosulfate de sodium (0,02N) après avoir ajouté 75 ml d'eau distillée, en utilisant l'empois d'amidon comme indicateur coloré.

Un **essai à blanc** est préparé en suivant le même mode opératoire. L'indice de peroxyde (IP) s'effectue de la manière suivante :

$$IP = \frac{(V_1 - V_0) \times C}{m} \times 100$$

V₀ : Volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour l'essai à blanc ;

V₁ : Volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour la détermination ;

C : Concentration en moles/litre, de la solution titrée de thiosulfate de sodium utilisée.

m : Masse (g) de la prise d'essai.

2.2.2.2 Etude des acides gras et des glycérides

a. Indice de saponification (NF ISO 3657)

Si la détermination de l'indice de saponification est une opération caractéristique de l'analyse des lipides, elle est destinée essentiellement aux contrôles industriels (savonnerie). Elle consiste à transformer en savons solubles (sodiques ou potassiques) la totalité des acides gras présents à l'état estérifié dans une matière grasse et à régénérer le glycérol dans le cas des triglycérides (**ADRIAN et al., 1998**).

L'indice de saponification ou *indice de Koettstoerfer* est la masse en milligrammes de potasse nécessaires pour saponifier 1 g de corps gras. En effet, plus les molécules d'acides ont d'atomes de carbone, moins l'indice de saponification est élevé. Il rend compte de la longueur des chaînes hydrocarbonées des acides gras. (**OLLE, 2002 ; SALGAROLO, 2003**). La réaction de saponification est complète, irréversible et rapide. Elle est à différencier de la réaction d'estérification qui est incomplète, réversible et lente.

Saponification : $R-COO-R' + KOH \rightarrow R-COO^- + K^+ + HO-R'$

Hydrolyse/ Estérification : $R-COO-R' + H_2O \rightarrow R-COOH + HO-R'$

2g d'huile sont dissous dans une solution de KOH (0,5N) dans l'éthanol, sont introduits dans un ballon à col rodé. Le ballon est connecté à un réfrigérant à reflux et porté à ébullition durant au moins 60 minutes, en agitant de temps en temps. L'excès de KOH est titré par une solution d'acide chlorhydrique HCL (0,5N), en présence de phénolphaléine. Un **essai à blanc** est préparé en suivant le même mode opératoire. L'indice de saponification (IS) se détermine ainsi :

$$IS = \frac{(V_0 - V_1) \times C \times 56.1}{m}$$

V₀ : Volume d'acide chlorhydrique (ml) nécessaire pour titrer le blanc

V₁ : Volume d'acide chlorhydrique (ml) nécessaire pour titrer l'essai.

C : Concentration en moles/litre, de la solution titrée d'acide chlorhydrique utilisée,

m : Masse (g) de la prise d'essai.

b. Indice d'iode (NF ISO 3961)

L'indice d'iode appelé aussi *indice de Hübl*, est la masse en grammes d'iode fixé sur les doubles liaisons présentes dans 100 g de corps gras (**SALGAROLO, 2003**). La méthode de Wijs est certainement la plus utilisée (possibilité de trouver dans le commerce du réactif prêt à l'emploi) (**OLLE, 2002**).

Le dosage consiste à faire réagir une solution halogénante, 25 ml de réactif de Wijs sur une masse d'échantillon de 0,2 à 0,3 g préalablement dissous dans 15 ml de tétrachlorure de carbone. L'eren contenant la solution est bouché hermétiquement et placé dans un endroit sombre pendant une heure après l'avoir agité fortement. On ajoute ensuite 20 ml d'iodure de potassium (KI) à 10 % et 150 ml d'eau distillée afin d'extraire l'iode en excès dans la phase aqueuse. On titre par le thiosulfate de sodium Na₂S₂O₃, 0,1N en présence d'empois d'amidon et cela jusqu'à décoloration complète des deux phases (**SALGAROLO, 2003**). La réaction peut être accélérée par l'emploi d'un catalyseur, l'acétate mercurique dans l'acide acétique (**GUILLEMIN, 2006**).

Un **essai à blanc** est préparé en suivant le même mode opératoire. L'indice d'iode se détermine de la manière suivante :

$$II = \frac{[(V_0 - V) \times C \times 12.69]}{m}$$

V₀ : volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour l'essai à blanc;

V₁ : Volume de thiosulfate de sodium (ml) nécessaire pour la détermination;

C : Concentration en moles/litre, de la solution titrée de thiosulfate de sodium utilisée.

m : Masse (g) de la prise d'essai.

2.2.2.3 Etude des constituants non glycéridiques

a. Mesure de la teneur en insaponifiable NFT 60-205

L'insaponifiable est constitué par l'ensemble des composés extractibles par les solvants organiques (hexane, éther éthylique) directement après traitement du corps gras par la potasse alcoolique.

Après saponification du corps gras, la fraction insaponifiable peut être extraite (à l'aide d'hexane ou d'oxyde diéthylique) puis pesée après séchage. On entend par matières insaponifiables d'un corps gras, l'ensemble des produits présents dans ce corps gras qui, après saponification de celui-ci par hydroxyde alcalin, extraction par un solvant spécifié et élimination de ce dernier, restent non volatils dans les conditions opératoires décrites dans la norme NF T60-205 Nou :1975.

Cet ensemble est formé des constituants naturels des matières grasses tels les stérols, les alcools aliphatiques supérieurs, les pigments, les hydrocarbures, ainsi que les substances organiques étrangères non volatiles à 103 °C.

Le principe est basé sur la saponification du corps gras par traitement à l'ébullition à reflux avec une solution éthanolique d'hydroxyde de potassium, extraction de l'insaponifiable de la solution de savon au moyen d'un solvant spécifié, évaporation du solvant et pesée du résidu après séchage à 103 °C.

Dans un ballon muni d'un réfrigérant, 10 grammes d'huile sont saponifiés avec KOH 2N éthanolique et portés à ébullition pendant 1 heure. Tout de suite 100 ml d'eau sont ajoutés. Cette solution est transvasée dans une ampoule à décanter et le ballon est rincé avec 30 ml d'hexane ; le tout est agité énergiquement et abandonné au repos pendant quelques minutes.

La phase savonneuse est soutirée dans une seconde ampoule ; cette opération doit être répétée deux autres fois avec à chaque fois environ 30 ml d'hexane (95 %).

Les extraits sont retirés dans la deuxième ampoule et sont lavés avec 100 ml de mélange eau/éthanol (v/v) à trois reprises en agitant vigoureusement et en éliminant la couche hydroalcoolique après chaque lavage. Il faut vérifier avec la phénolphthaléine que le liquide de lavage ne vire plus au rose. La solution qui reste dans l'ampoule est transvasée dans un ballon séché et taré pour subir une évaporation à l'évaporateur rotatif. Le ballon est pesé.

La teneur en insaponifiable se calcule ainsi :

$$Ins = \frac{m_1 \times 100}{m}$$

m_1 : masse du résidu séché en grammes

m_2 : masse en grammes de la prise d'essai.

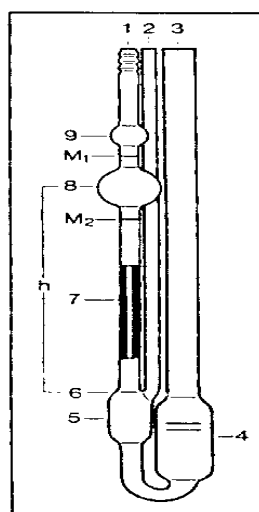
Remarque : Toutes les analyses ont été répétées trois fois (ou plus, comme pour l'indice d'iode) et toutes les solutions étaient étalonnées avant analyse.

2.3 Étude viscosimétrique

La viscosimétrie est considérée comme une méthode de caractérisation utilisée pour la détermination des masses moléculaires exigeant un calibrage par d'autres méthodes telles que l'osmométrie, la diffusion de la lumière ou l'ultracentrifugation (équilibre de la sédimentation). Elle reste parmi les procédés expérimentaux les plus utilisés dans la caractérisation des polymères à cause de la simplicité de sa mise en œuvre et de ses performances expérimentales. Généralement, deux types de viscosimètres sont utilisés :

- ✓ Le viscosimètre rotatif à comportement Newtonien
- ✓ Le viscosimètre à capillaire (type Ubbelohde utilisé dans notre présent travail) dont les données expérimentales sont souvent extrapolées à concentration nulle pour d'éventuelles interprétations supplémentaires.

La viscosité a été mesurée avec un viscosimètre capillaire type Ubbelohde, avec un bain thermostaté à $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$. La viscosité réduite ($\eta_{\text{red}} = \eta_{\text{sp}}/c$) a été calculée en divisant la viscosité spécifique ($\eta_{\text{sp}} = \frac{\eta - \eta_0}{c}$ où η et η_0 sont les viscosités de la solution et du solvant, respectivement) par la concentration en esters exprimée en g/ml. Les masses macromoléculaires ont été déterminées sur un spectrophotomètre de diffusion de lumière Brice-Phenix.



- 1-Tube avec capillaire
- 2-Tube de ventilation
- 3-Tube de remplissage
- 4-Réservoir
- 5-Récipient de détente
- 6-Calotte sphérique
- 7-Tube capillaire
- 8-Boule de mesure
- 9-Boule d'entrée

Figure 2.2 Viscosimètre capillaire (type Ubbelohde) (BENMANSOUR, 2004)

2.4 Estérification des fractions huileuses

2.4.1 Isolement des acides gras

Dans un ballon de 250 ml surmonté d'un réfrigérant à reflux, sont introduits 3.41g de la fraction huileuse à étudiée, 15 ml d'éthanol, 15 ml d'eau distillée et 3 g d'hydroxyde de potassium. L'ensemble est porté à reflux pendant environ 45 minutes. Après évaporation de l'éthanol, la phase aqueuse est extraite avec 15 ml d'éther di-éthylique. Après décantation et acidification de la phase aqueuse avec du HCl concentré (38 %), l'extraire avec 20 ml d'éther di-éthylique puis distiller le solvant. Le résidu d'acide gras est ainsi obtenu.

2.4.2 Méthylation des acides gras

3 g d'acide gras et 25 ml d'éthanol sont introduits dans un ballon triols (250 ml). 1ml d'acide sulfurique concentré est ajouté goutte à goutte. Le mélange est porté à reflux pendant environ 2 heures. Le mélange réactionnel est laissé température ambiante durant 2 heures. 300 g de glace pilée sont ajoutés au mélange puis décantés dans une ampoule. Après extraction de la phase aqueuse avec du chloroforme, la phase organique est séchée avec du Na₂SO₄ anhydre et évaporé à sec. Une fraction lipidique d'ester méthylique est obtenue. Des spots de chaque ester méthylique obtenu sont déposés sur une plaque de silica gel en vue de subir une analyse spectrale. L'élution se fait avec plusieurs combinaisons du système de solvants (éther de pétrole/chloroforme).

2.5 Analyse chromatographique des esters méthyliques

L'extrait de méthyle esters (2g) a été purifié par chromatographie sur colonne 1150mm longues et 35 mm de diamètre, remplie avec 250 g de gel de silice S, éluée par la suite avec un mélange de l'éther de pétrole-chloroforme (9:1). Un total de 10 fractions a été recueilli et unis en 2 fractions, une grande (1,6 g) et une mineure (0,4 g). Un composant a été obtenu à l'état pur à l'aide de la chromatographie préparative sur couche mince.

En vue de leurs caractérisations, les huiles et le composé majoritaire obtenu ont subi plusieurs investigations :

- La chromatographie analytique sur couche mince (CCM) est réalisée sur des feuilles plastiques recouvertes d'une couche de gel de silice 60F254 d'une épaisseur de 0,25 mm, prêtes à l'emploi, fournies par Merck.
- Les chromatographies préparatives sur colonne utilisent le gel de silice de granulométrie 0,063-0,200 mm, fourni par Merck.
- Chromatographie en phase gazeuse de l'ester gras est effectuée sur un chromatographe à gaz GIRDEL, 2 m colonne, emballé avec la DEGS sur chromosorb W (60-80 mesh). L'azote du gaz porteur, le taux de papier 5 mm / mn, la température programmée pour 70 à 180 °C avec de 3 °C / mn. A 210 °C par injection conditions isothermes. La détection a été de mode sur un détecteur de flamme lonzing.
- Les spectres d'absorption dans l'infrarouge (IR) sont enregistrés sur un appareil GENESIS SERIES FTIR (ATI-MATTSON, 4000-600 cm⁻¹).
- Les spectres de résonance magnétique nucléaire RMN du proton et du carbone 13 sont enregistrés sur un appareil BRUCKER AC, à 400 MHz avec des échantillons en solution dans le chloroforme (CDCl₃) deutéré. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm, le (TMS) étant pris comme référence. La multiplicité des signaux est indiquée par les abréviations suivantes : s, singulet ; t, triplet ; m, multiplet ou massif.

2.6 Évaluation microbiologique

2.6.1 Matériel fongique

Le support fongique retenu pour cette étude est constitué par des souches d'*Aspergillus* notamment *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus* isolées respectivement du blé tendre et des arachides. Ces souches ont été fournies par le laboratoire de recherche sur la valorisation des ressources végétales et la sécurité alimentaire dans les zones semi-arides du Sud-ouest algérien de l'université de Bechar.

2.6.1.1 Confirmation des souches testées

a. Confirmation du genre

L'identification des moisissures fait essentiellement appel aux caractères cultureux et morphologiques (**BOTTON et al., 1990**) :

■ **Caractères cultureux** : ce sont les critères macroscopiques tels, la vitesse de croissance, la texture, la couleur du thalle, la couleur du revers de la culture, l'odeur exsudat et la présence d'un pigment diffusible (**CHABASSE et al., 2002**).

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

☞ L'étude des caractères morphologiques est réalisée par une méthode classique dite méthode de Scotch, ces caractères sont confirmés par la technique de micro culture décrite par **HARIS 1989**.

■ Technique de Micro culture

Décrite par **HARIS (1989)**, cette technique consiste à inoculer les spores des moisissures sur des lames menées de petits carrés de PDAA solidifiés et les recouvrir par des lamelles. Les spores sontensemencées sur les limites périphériques du milieu pour leur fournir un potentiel d'oxygène élevé afin qu'elles puissent germer. L'ensemble est conditionné dans une chambre stérile et humide puis incubée à $25 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 3 à 5 jours. Après incubation, les lamelles auxquelles s'adhèrent le mycélium sont, transférées sur d'autres lames stériles contenant quelques gouttes de lactophénol pour l'observation microscopique aux grossissements 10, $\times 40$, $\times 100$.

☞ Le genre *Aspergillus* est déterminé par les caractères cultureux et microscopiques en se référant au manuel de **BARNETT (1972)**.

b. Confirmation de l'espèce

L'identification des espèces d'*Aspergillus* est réalisée par la méthode de **PITT et HOCKING (1973)** cette méthode est dite « **Single Spore** », basée sur la relation entre l' a_w du milieu de culture et la température d'incubation. Elle consiste en l'inoculation de quelques spores d'une culture jeune dans des tubes à hémolyse contenant une suspension semi-solide à base de 0,2 % d'Agar et 0,05 de Tween 80.

☞ L'identification des espèces d'*Aspergillus* se fait sur trois milieux différents qui sont :

- ✱ Malt Extract Agar (**M.E.A**) à 25 °C,
- ✱ Glycérol Nitrate Agar (**G25N**) à 25 °C,
- ✱ Czapek Yeast Agar (**C.Y.A**) à deux températures différentes : 5 °C et 37 °C

☞ Ces milieux sont inoculés comme le montre la Figure suivante.

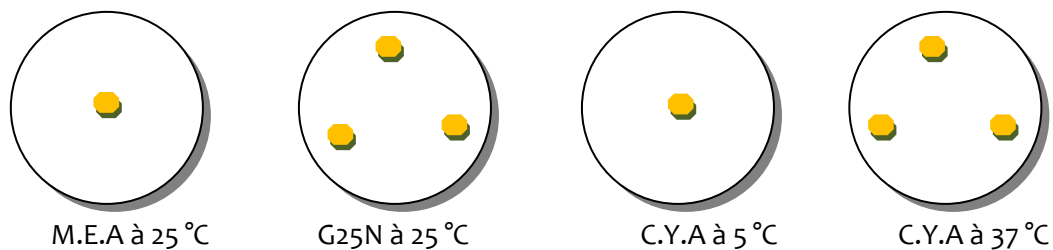


Figure 2.3 Type d'inoculation des différents isolats d'*Aspergillus*.
PITT et HOCKING (1973)

☞ La lecture se fait après 7 et 14 jours en se référant aux clefs d'identification de **PITT et HOCKING (1973)**. La confirmation des souches présumées *Aspergillus flavus* est faite par une inoculation sur le milieu AFAP à 25 °C, ce dernier donne un revers de culture (Revers plate) orange. La souche d'*Aspergillus flavus* identifiée est conservée dans des tubes inclinés de PDAA à 4 °C.

2.6.1.2 Test de mycotoxinogénie

Les souches d'*Aspergillus* (*flavus* et *ochraceus*) identifiées et cultivées sur milieu PDAa pendant 5 jours à 25 ± 2 °C sont soumises aux analyses mycotoxicologiques.

a. Ensemencement sur milieu Y.E.S

Les souches d'*Aspergillus* sont ensemencées sur milieu Y.E.S (Yeast Extract Sucrose), riche en vitamines B complexes, ce milieu favorise la métabolisation secondaire et induit les réactions anabolisantes. L'incubation se fait à 30 ± 2 °C pendant 14 jours.

b. Analyse chromatographique par C.C.M

■ Extraction des aflatoxines/ l'OTA

Après 14 jours d'incubation, on se débarrasse de la biomasse formée en filtrant le milieu Y.E.S à travers du papier filtre. 50 ml du filtrat obtenu sont additionnés à 180 ml de chloroforme, le tout est vigoureusement agité pendant 30 min, on laisse ensuite le mélange décanté en utilisant une ampoule (Ampoule à décantation). La phase chloroformique ainsi obtenue est filtrée puis concentrée par évaporation à l'aide d'un rotavapor jusqu'à un volume de 2 à 3 ml (AMROUCHE, 2007).

■ Séparation chromatographique

Elle se fait sur une plaque de sélicagel sur laquelle sont déposés deux spots de 20 µl et 40 µl de chaque extrait à analyser et 5 µl de chaque solution standard d'Aflatoxines. La plaque est ensuite placée dans une cuve chromatographique et trempée dans un solvant d'élution constitué de Toluène, Acétate d'éthyle et l'acide formique de volume (5, 4, 1) respectivement. Après migration et évaporation du produit d'élution, la plaque est examinée sous UV à 365 nm. La présence d'Aflatoxines se traduit par des fluorescences caractéristiques (bleu foncé pour les AFB et bleu clair pour l'OTA, de même Rf que l'étalon) (AMROUCHE, 2007).

2.7 Évaluation de l'activité antifongique des huiles

Les huiles extraites à partir des graines de *Citrullus colocynthis* L., *Linum usitatissimum* L. et *Nigella sativa* L. ainsi que les esters qui ont été extraits de ces huiles ont subi une investigation de leurs activités antifongiques par deux techniques à savoir l'évaluation de la croissance radiale sur milieu solide et l'évaluation de la biomasse sur milieu liquide.

2.7.1 Croissance radiale sur milieu solide

2.7.1.1 Préparation de l'inoculum

À l'aide d'une pipette pasteur et à partir d'une culture de 7 jours, les spores de la souche testée ont été mises dans une suspension semi-solide à base de 0,2% d'Agar et 0,05 de Tween 80, le mélange est ensuite agité vigoureusement à l'aide d'un vortex afin de mettre en suspension le contenu sporal.

2.7.1.2 Principe

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des huiles et des esters ont été déterminées selon la méthode rapportée par **REMMAL et al (1993) et SATRANI et al (2001)**. Du fait de la non-miscibilité de nos substrats à l'eau et donc au milieu de culture, la mise en émulsion a été réalisée grâce à une solution d'Agar à 0,2 % afin de favoriser le contact germe/composé. Des dilutions sont préparées au **1/10, 1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/300** et **1/500** dans cette solution d'Agar. Dans des tubes à essai contenant chacun 13,5 ml de PDAA, stérilisés autoclaves (20 min à 121 °C) et refroidis à 45 °C, on ajoute 1,5 ml de chacune des dilutions de façon à obtenir les concentrations finales de **1/100, 1/250, 1/500, 1/1.000, 1/2.000, 1/3.000** et **1/5.000 (v/v)**.

Parallèlement à ces concentrations, un test préalable de l'activité antifongique de ces huiles a été réalisé. Une gamme de concentrations des huiles a été directement ajoutée au milieu de culture. La technique consiste à placer simultanément dans des tubes à essai différents volumes des huiles à tester et les compléter à 20ml par le milieu PDAA afin d'obtenir les concentrations suivantes : **50 µl/ml, 100 µl/ml, 150 µl/ml, 200 µl/ml, 250 µl/ml, 275 µl/ml et 300 µl/ml**. Après agitation des tubes à l'aide d'un vortex leurs contenus sont coulés dans des boîtes de pétries (**HIBAR et al., 2006**). Convenablement vortexer le

contenu des tubes est ensuite versé dans des boîtes de pétri. À l'aide d'une anse de platine, une goutte de la suspension sporale préparée est déposée au centre de chaque boîte. Chaque essai est répété cinq fois.

La croissance radiale mycélienne est mesurée à partir du 3^{ème} jour d'incubation et juste avant que les filaments mycéliens n'atteignent la périphérie des boîtes témoins (7^{ème} jours) (SORO *et al.*, 2010 ; KRA *et al.*, 2009). Le principe de cette méthode est illustré dans la Figure 1.5

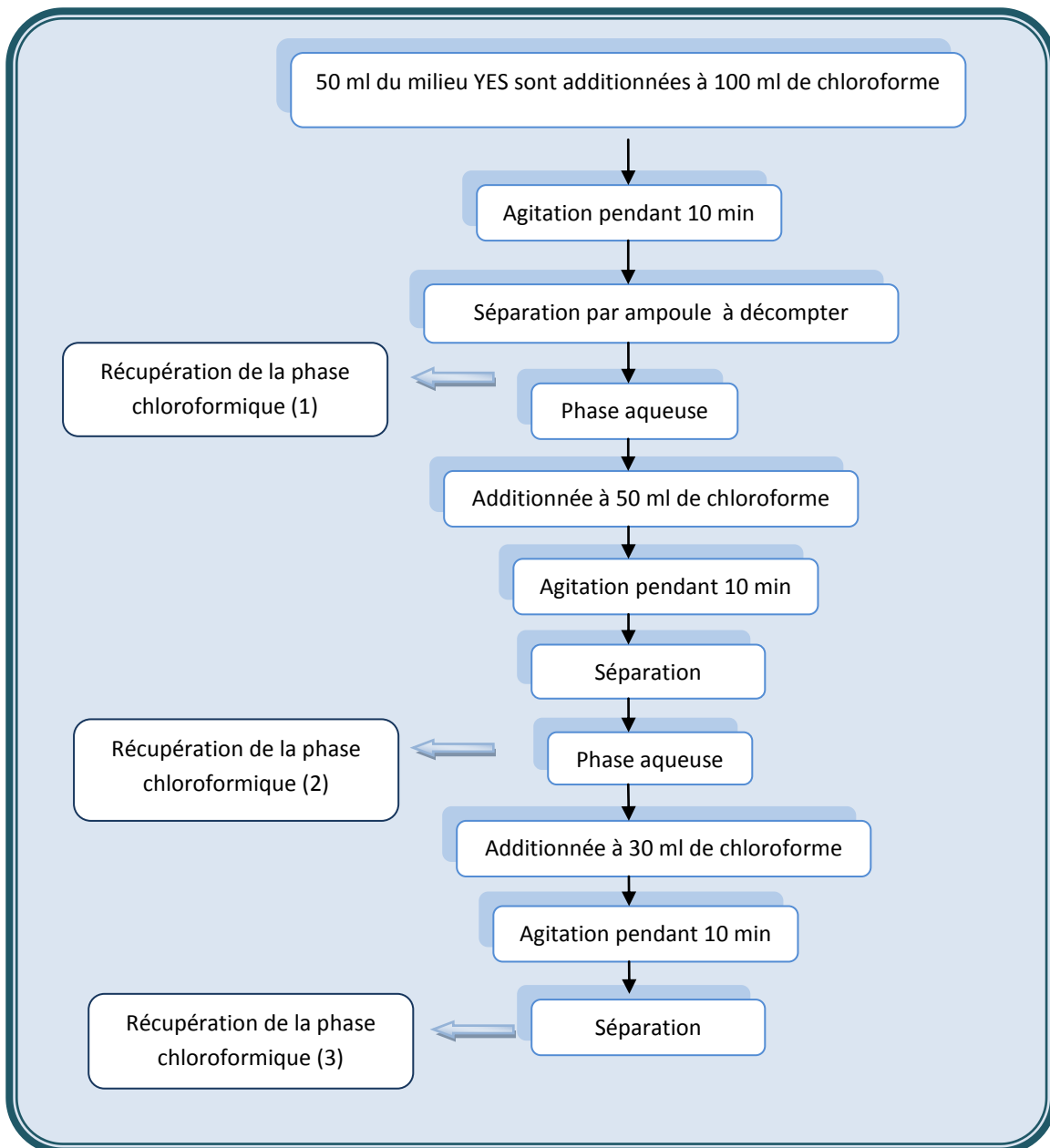


Figure 2.4 Méthode d'extraction des aflatoxines et des ochratoxines (AMROUCHE, 2007)

2.7.1.3 Expressions des résultats

Après incubation à 25 ± 2 °C pendant 2 à 7 jours en tenant compte de la croissance de témoin, les diamètres sont mesurés à l'aide d'une règle, à l'extérieur de la boîte fermée, on calcule l'indice antifongique (Pourcentage d'inhibition) qui est déterminé par la formule :

$$\text{Indice antifongique} = (1 - D_a / D_b) \times 100 \text{ (WANG et al., 2005 ; SINGH et al., 2009)}$$

avec :

Da : Diamètre de la zone de croissance de l'essai

Db : Diamètre de la zone de croissance du témoin.

Les boîtes ne présentent pas de croissance, le disque de mycélium est transféré sur un milieu PDA neuf pour confirmer s'il s'agit d'un effet fongistatique ou fongicide. Après l'inhibition de la croissance on détermine la concentration minimale inhibitrice **C.M.I** des huiles testées.

2.7.2 Évaluation de la biomasse sur milieu liquide

2.7.2.1 Préparation de l'inoculum

Pour l'évaluation de la biomasse en milieu liquide on procède à un comptage du nombre des spores à l'aide de la cellule de Malassez afin d'obtenir une concentration de 10^6 spores/ml (SERGHAT et al., 2004)

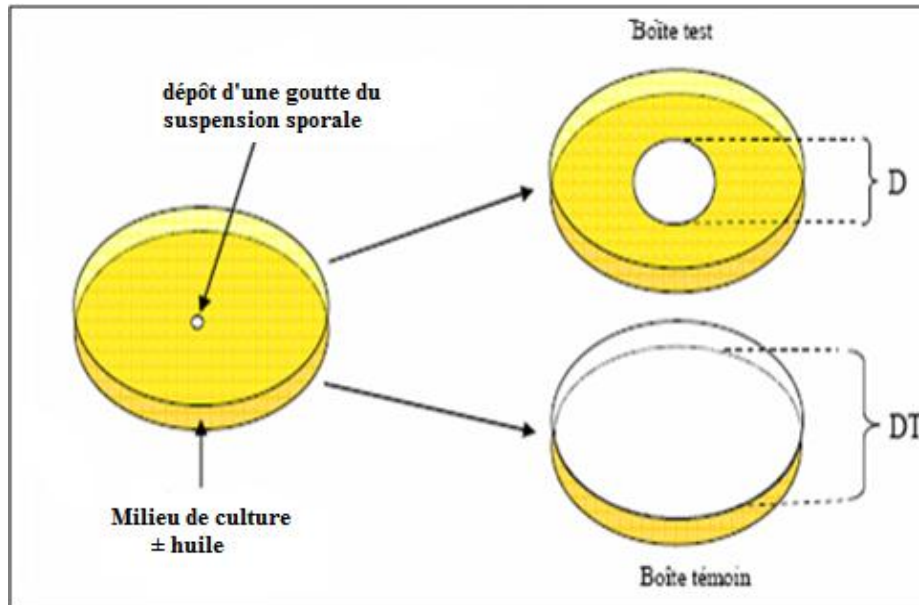


Figure 2.5 Principe d'évaluation d'activité antifongique des huiles par la méthode de croissance radiale (MUNIZI, 2008).

2.7.2.2 Principe

La technique consiste à mettre différents volumes des substrats à tester dans des flacons et compléter à 50 ml par le milieu PDBa (Potato Dextrose Broth acidifié) afin d'obtenir les concentrations suivantes : **20 µl/ml, 40 µl/ml, 60 µl/ml, 80 µl/ml, 100 µl/ml, 110 µl/ml, et 120 µl/ml**. Ces cultures liquides sontensemencées par 30 µl de la suspension sporale (10^6 spores/ml) préparés à raison de trois flacons par concentration d'huile. Des flacons témoins sont aussi préparés. L'ensemble des flacons est incubé à ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) pendant 14 jours (TUBAJIKA, 2006 ; HIBAR *et al.*, 2006).

Les esters bruts et les esters majoritaires extraits des huiles ont eu aussi fait l'objet de l'évaluation de l'activité antifongique sur milieu liquide. Le tableau () ci-dessous donne les différentes concentrations testées.

Tableau 2.1 Concentrations des esters bruts et majoritaires testées en milieu liquide

V µl	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
C µl/ml	0.2	0.4	0.6	0.8	1	1.2	1.4	1.6	1.8	2

Après les 14 jours d'incubation, le contenu des flacons est filtré par le biais d'un papier filtre, ce dernier par la suite est séché à 60 °C pendant 24 heures (**DHANDHUKIA & THAKKAR, 2007**).

2.7.2.3 Expression des résultats

Le poids de la biomasse formé (**P**) est déterminé selon la formule suivante décrite par (**IMTIAJ & LEE, 2007**) :

$$P = P_1 - P_0$$

Où :

P_0 : Poids de papier filtre.

P_1 : Poids de papier filtre et la biomasse fongique formée après séchage.

2.7.3 Evaluation de l'effet antifongique par synergie des huiles

La synergie est l'un des principes qui régissent le monde naturel. Ce n'est pas seulement un effet qui est omniprésent dans la nature, mais également considéré comme l'une des raisons de la complexité croissante du processus évolutif. D'une manière générale, la synergie est définie comme étant l'effet combiné ou cumulatif produit par les interactions entre les différentes forces, particules, éléments, des substances (**BIAVATTI, 2009**).

La synergie, terme de polyvalence est souvent utilisé pour expliquer les effets des constituants trouvés dans de nombreux produits de phytothérapie et de leurs extraits en particulier là où il est difficile de distinguer le principe actif (**HOUGHTON, 2007**). Il est connu que les plantes contiennent une grande diversité de micromolécules spécialisées et des composés phytochimiques présentant des interactions synergiques (**BIAVATTI, 2009 ; MULYANINGSIH, 2010**).

L'effet antifongique synergique des huiles a été testé par la méthode rapportée par **REMMAL et al. (1993)** et **SATRANI et al. (2001)**. A cet effet une solution mère au 1/10 à été préparée dans une solution d'agar 0.2 % pour chacune des formules combinant les différentes huiles [**HC/HL, HC/HN, HL/HN** et **HC/HL/HN**] les solutions mères ont été dispersées à l'aide d'un sonificateur pour une meilleure homogénéisation et dispersion des huiles. En vue de tester l'effet antifongique synergique des trois huiles étudiées, on prélève aseptiquement 1,5 ml v/v de chacune des dilutions entre deux huiles ou entre les trois huiles ensemble v/v/v, qu'on rajoute aseptiquement à 13.5 ml du milieu *Potatos Dextrose Agar* en vue d'obtenir les concentrations finales voulues de **1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/5000**. Les tubes sont agités au mixeur vortex puis le contenu est coulé dans des boîtes de pétri. Pour chaque dilution cinq boîtes sont préparées.

2.8 Etude *in vivo*

Les mycotoxines constituent une menace insidieuse pour la santé publique et la santé vétérinaire. Une des caractéristiques générales est la très grande hétérogénéité des contaminants dus à des conditions microclimatiques extrêmement variables au sein ou en périphérie des végétaux stockés. Un second point à considérer est leurs transferts dans la chaîne alimentaire animale, avec des phénomènes de métabolisation pouvant générer des métabolites eux-mêmes toxiques pouvant emprunter des voies d'excrétion spécifiques. À côté d'effets toxiques aigus ou chroniques, hémorragiques, immunotoxiques, hépatotoxiques, néphrotoxiques, neurotoxiques, oestrogéniques ou tératogènes, certaines mycotoxines ont démontré des effets mutagènes et cancérogènes chez l'animal de laboratoire et même l'homme.

Une des voies de la recherche scientifique actuelle est le recours à la pharmacopée traditionnelle. En effet, les plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et ils possèdent un très large éventail d'activités biologiques. Les métabolites issus des plantes restent l'objet de nombreuses recherches *in vitro* et *in vivo*

L'objectif assigné à cette étude est l'essai de l'évaluation de l'impact régulateur probable de l'huile de *Citrullus colocynthis* L. et de l'huile de *Nigella sativa* L. vis à vis de la toxicité des mycotoxines.

2.8.1 Matériel biologique

2.8.1.1 Choix et préparation des animaux

Notre étude expérimentale a porté sur des rats males de type wistar en croissance, ayant un poids de départ moyen de 80±5 g. Après un mois (3 semaines d'allaitement et une semaine d'adaptation, les animaux sont répartis en deux groupes de six lots (n=5). chaque lot a reçu un régime spécifique.

Ces rats sont élevés au sein de l'animalerie (département de Biologie, université de Tlemcen - laboratoire de recherche de produits naturels (LAPRONA). Avant l'administration des régimes, ces rats sont nourris avec un aliment de commerce équilibré de type **EL ALAF**, boivent de l'eau de robinet *ad libitum* et sont gardés à une température ambiante de 25°C±2, cycle de lumière 12 h/12 h et ceci pendant toute la durée de l'expérimentation. **EL ALAF** est un aliment standard constitué de maïs, de tourteaux de soja, calcaire, phosphate, sels, acides aminés, oligo-éléments, poly vitamines, antioxydants, des facteurs de croissance, 17% protéine, 7.83% matière grasse, 7.11% fibres, 49.59% glucides, 5.89% cendres, des vitamines et 13% teneur en eau

Tableau 2.2 Composition des régimes en pourcentages pondéraux et en valeurs énergétiques.

Constituants (g/100g de régime)	Régime a base d'huile de tournesol	Régime a base d'huile de C.colocynthis	Régime a base d'huile de N.sativa	Valeurs énergétiques Kcal
caséine	16	16	16	65.6
méthionine	0.3	0.3	0.3	1.23
amidon	60.33	60.33	60.33	247.35
saccharose	05	05	05	20.5
Cellulose	05	05	05	-
Sels minéraux	7.37	7.37	7.37	-
vitamines	02	02	02	-
huiles	4%	4%	4%	
	10% AGS	15% AGS	16.1% AGS	
	30% AGMI	7.8% AGMI	24.1% AGMI	37.2
	60% AGPI	77.2% AGPI	59.7% AGPI	
TOTAL	100	100	100	


2.8.1.2 Evaluation de l'effet des huiles


a. Constitution des lots de rats


Les rats sont répartis en deux groupes de cinq lots (n=5), soumis aux différents régimes et suivis pendant deux mois d'expérience avec la mesure quotidienne du poids corporel.


■ Groupe 1, constitué de cinq lots de rats (n=5)

📖 **Lot RI** reçoit un régime témoin à base d'huile de tournesol à 4% et l'eau de source à libitum.


 **Lot RII** reçoit un régime témoin à base d'huile de coloquinte à 4% et l'eau de source à *libitum*.


 **Lot RIII** reçoit un régime témoin à base d'huile de nigelle à 4% et l'eau de source à *libitum*.


 **Lot RIV** reçoit un régime contaminé par l'OTA (250 µg/kg d'aliment) et l'eau de source à *libitum*.


 **Lot RV** reçoit un régime contaminé par l'AFB1 (120 µg/kg d'aliment) et l'eau de source à *libitum*.

■ Groupe 2, constitué de quatre lots de rats (n=5)

 **Lot RVI** reçoit un régime contaminé d'OTA (250 µg/kg d'aliment) à base d'huile de coloquinte à 4% et l'eau de source à *libitum*.

 **Lot RVII** reçoit un régime contaminé d'OTA (250 µg/kg d'aliment) à base d'huile de nigelle à 4% et l'eau de source à *libitum*.

 **Lot RVIII** reçoit un régime contaminé d'AFB1 (120 µg/kg d'aliment) à base d'huile de coloquinte à 4% et l'eau de source à *libitum*.

 **Lot RIX** reçoit un régime contaminé d'AFB1 (120 µg/kg d'aliment) à base d'huile de nigelle à 4% et l'eau de source à *libitum*.

Les poids des rats ainsi que la quantité d'aliments ingérée sont pris quotidiennement. À la fin de la huitième semaine de l'expérimentation ; c.-à-d. après (nombre de semaines de régimes) les rats sont mis à jeun pendant 12 heures, puis anesthésiés par une injection intrapéritoniale chloral hydraté à 10 % (0.3 ml/100 g du poids corporel du rat) en utilisant une seringue à **2 ml**. Le dosage de la glycémie était réalisé en déposant une goutte de sang sur une bandelette réactive (GOD, POD). La lecture se fait à l'aide d'un glucomètre (**Acku Chek Active**). Les valeurs moyennes de la glycémie sont exprimées en g/l.

Les prélèvements sanguins sont effectués à partir de l'artère abdominale pour obtenir la totalité du sang et ceci après incision abdominale. Une partie aliquote est recueillie sur des tubes héparinés pour réaliser l'étude biochimique, une autre partie aliquote est recueillie sur des tubes secs pour la séparation des lipoprotéines de lourdes densités.

Les organes (le foie, les reins, le pancréas, les testicules, le cerveau et le cœur) sont immédiatement prélevés, rincés avec de l'eau physiologique, séchés avec du papier filtre puis pesés.

b. Étude biochimique

Les paramètres biochimiques sont analysés sur du plasma (centrifugation à 3500tr/mn, pendant 15 min).

- **Dosage de protéines totales** : le dosage est réalisé par la méthode colorimétrique de Biuret « Kit **Chronolab** ». le taux de protéines totales est exprimé en g/l.
- **Dosage de l'albumine** : le dosage est réalisé selon la méthode de Doumas par le vert de bromocrésol « Kit **Chronolab** ». Les valeurs sont exprimées en g/L.
- **Dosages du cholestérol total et des triglycérides** : dosage effectué par des méthodes enzymatiques « Kit **Chronolab** ». Les valeurs moyennes sont exprimées en mol/l.
- **Dosage de créatinine** : le dosage de la créatinine est réalisé grâce à la méthode au picrate alcalin selon la méthode de Jaffé « Kit **Chronolab** ». Les valeurs sont exprimées en mg/dl.
- **Dosage de l'urée** : le taux de l'urée plasmatique est déterminé par la méthode enzymatique de l'uréase-Berthelot « Kit **Spinréact** ». Les résultats sont exprimés en mg/dl.
- **Dosage des transaminases (AST, ALT)** : le dosage est réalisé par une méthode enzymatique grâce au malate-déshydrogénase pour les AST et lactate-déshydrogénase pour les ALT « Kit **Spinréact** ». Les valeurs sont exprimées en U/l
- **Dosage du magnésium** : le taux de magnésium est déterminé par la méthode colorimétrique avec le calmagite dans une solution alcaline « Kit **Chronolab** ». Les résultats sont exprimés en mg/dl.
- **Dosage du Calcium** : la teneur en calcium est déterminée par méthode colorimétrique avec l'o-cresolphtalein dans un milieu alcalin « Kit **Chronolab** ». Les résultats sont exprimés en mg/dl.

c. Biochimie des urines

La biochimie des urines est réalisée sur celles récupérées des cages métaboliques dans des tubes (**épendorfs**), une goutte d'huile de tournesol est ajoutée pour éviter leur évaporation. Le tout est centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 min dans une centrifugeuse de type **eppendorf 5702R** puis conservé dans le réfrigérateur à 4°C. Les paramètres chimiques (pH, densité, sang, leucocytes, protéines, nitrite, et glucose) sont détectés à l'aide des bandelettes réactives à usage *in vitro* de la marque **Multistix**.

d. Analyse statistique des données

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de moyenne \pm erreur standard (ES). Après analyse de variance, la comparaison des moyennes entre les différents lots de rats est réalisée par le test « t » de student, par un logiciel simple Excel 2007.

Moyenne (m)

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_1 X_1$$

Variance (v)

$$V_x = \frac{1}{n} \sum (X_1 - \bar{X})^2$$

Écart type (σ)

$$\sigma_x = \sqrt{V_x}$$

Erreur standard de la moyenne (ESM)

$$Sm = \frac{\sigma}{\sqrt{n-1}} = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{n(n-1)}}$$

Test de Student : Le degré de liberté dépend de la taille de l'échantillon.

$$t_e = \frac{|\bar{X}_1 - \bar{X}_2|}{\sqrt{\sigma^2 \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right]}}$$

La valeur de « t_e » donne le degré de signification « p » lu sur la table de Student. La différence entre deux moyennes est :

- ☞ significative si $p < 0,05$;
- ☞ très significatives si $p < 0,01$;
- ☞ hautement significatives si $p < 0,001$.

Chapitre 3

*Caractérisation des huiles
étudiées*

CHAPITRE 3

3.1 Introduction

Depuis l'origine de l'humanité, les plantes et toutes les matières naturelles ont été les seuls remèdes dont disposait l'être humain pour soigner ses maladies. Une thérapie basée sur le savoir empirique, ancestrale, sur l'usage traditionnel transmis oralement au cours des siècles. La thérapie par les plantes et leurs extraits restait prépondérante jusqu'à 1930. Les chimistes du XIX siècle firent de la phytothérapie un pas géant par les découvertes des véritables principes actifs. Depuis quatre-vingts ans, les progrès de la chimie d'extraction puis la chimie de synthèse permettent d'obtenir les principes actifs à l'état pur.

Un certain nombre de plantes médicinales est encore utilisé de nos jours sous forme de décoctions et infusions, mais la plupart d'entre elles ont été délaissées au profit de produits pharmaceutiques de synthèse. Cependant, les connaissances actuelles permettent d'analyser ces plantes et souvent de comprendre l'activité préconisée par nos ancêtres. Une relation entre la structure chimique et l'activité biologique est alors tentante, aussi la production des molécules naturelles pourrait entrer dans la composition de médicaments moins agressifs vis-à-vis de l'organisme, ou à des fins industrielles précédemment exposées.

Dans le règne végétal, biodiversité rime avec infinie diversité de formes et de molécules. Cette capacité inégalée des plantes à produire des composés bioactifs est mise à profit dans la recherche de substances naturelles à activité biologique.

Les substances naturelles issues des végétaux ont des intérêts multiples mis à profit dans l'industrie : en alimentation, en cosmétologie et en dermatopharmacie. Parmi ces composés on retrouve dans une grande mesure les métabolites secondaires qui se sont surtout illustrés en thérapeutique. La pharmacie utilise encore une forte proportion de médicaments d'origine végétale et la recherche trouve chez les plantes des molécules actives nouvelles, ou des matières premières pour la semi-synthèse (**BAHORUN, 1997**). Les propriétés des plantes dépendent de la présence des agents bioactifs variés et appartenant à différentes classes chimiques notamment les fractions huileuses pouvant être mises à profit pour réduire la flore fongique contaminante (**OURAINI et al., 2005**).

Les huiles végétales représentent un vaste ensemble très varié de corps gras d'origine, de composition, de qualité et de goûts différents. Celles-ci sont présentées selon leurs caractéristiques physico-chimiques, leur mode de fabrication, leur composition en acides gras, en vitamines, en composés mineurs, leur intérêt nutritionnel et leurs usages. Toutes ont un intérêt différent (**LECERF, 2011**).

NDEYE (2001) avait émis que La qualité d'une huile dépend essentiellement de sa composition chimique et que, suivant les conditions de son extraction ou de conservation, les divers éléments constitutifs peuvent subir des modifications plus ou moins importantes pouvant porter préjudice à la qualité de l'huile.

Ces huiles sont principalement composées de triglycérides (90 à 99%) eux-mêmes essentiellement constitués d'acides gras (90 à 95%) et de glycérol (3 à 5%) et, de constituants mineurs naturels (1 à 5%) regroupant des composés de structure variée tels que les stérols, tocophérols, caroténoïdes (0.1 à 0.2%) (**PAGES, 2008**). De par leurs compositions, **ces** huiles remplissent plusieurs rôles principaux : *nutritionnel*, apport d'énergie et de nutriments (acides gras, vitamines liposolubles, constituants mineurs d'intérêts tels que les poly stérols ou les composés phénoliques); *Organoleptique* (flaveur et support d'aromes); *rhéologique* (texture) et *technologique*. Elles peuvent également être utilisées en médecine traditionnelle. Ces huiles peuvent contenir aussi des composés antinutritives et toxiques endogènes et exogènes pouvant nuire à la qualité de ces huiles (**NDEYE, 2001**).

Cette première partie de ce travail vise à étudier les caractéristiques physico-chimiques des métabolites primaires (huiles) issues des graines des trois plantes médicinales utilisées *Citrullus colocynthis L.*, *Linum usitatissimum L.* et *Nigella sativa L.*

Le travail expérimental réalisé au cours de sa première partie a pour but d'extraire l'huile des graines des plantes sélectionnées par méthode de soxhlet contre un solvant apolaire (éther de pétrole), déterminer les caractéristiques physiques et chimiques relatives à la qualité de ces huiles ainsi que leurs comportements rhéologiques par une étude viscosimétrique. Dans la seconde partie, nous avons procédé à une séparation des esters majoritaires de ces huiles. Nous terminons notre étude par la détermination du profil chromatographique par CPG-SM, ainsi des caractérisations spectrales par RMN.¹H, RMN.¹³C et IR des huiles et de leurs esters.

3.2 Résultats

Les plantes médicinales sont une source intarissable de molécules intéressantes pour les scientifiques et le monde industriel. Les molécules issues de ces plantes sont le plus souvent assimilées à des principes actifs possédants des propriétés spécifiques qui leurs confèrent un caractère unique (ENDRIAS, 2006).

Ces plantes représentent un réservoir immense de composés potentiels attribués aux métabolites secondaires qui ont l'avantage d'être d'une grande diversité de structure chimique et possédant un très large éventail d'activités biologiques. Ces métabolites secondaires restent l'objet de nombreuses recherches *in vitro* qu'*in vivo*.

3.2.1 Rendement des extractions des huiles

Les huiles sujettes à l'expertise dans cette étude ont été extraites à l'aide de la méthode de soxhlet (6 heures d'extraction), en utilisant l'éther de pétrole comme solvant. L'éther de pétrole ayant une température d'ébullition aux alentours de 35-60 °C ce qui minimisera les traces résiduelles dans l'huile extraite.

L'analyse des résultats des rendements moyens des extractions des huiles concrétisées dans la figure 3.1, montre que les grains de *L.usitatissimum* et ceux de *Nigella sativa* ont affiché les meilleurs rendements ($R^{dt} \text{ Lin} = 39.96\%$ - $R^{dt} \text{ Nig} = 33.71\%$). Comme indiqué dans la littérature, les graines de *citrullus colocynthis* ont eu des rendements ne dépassant pas les 19% ($R^{dt} \text{ col} = 18\%$). Il est par ailleurs important de noter que le temps d'extraction nécessaire pour un rendement optimal en huiles a été aussi évolué. L'expérience a montré que six heures de reflux étaient nécessaires pour extraire toute l'huile contenue dans les grains.

Les huiles ainsi obtenues ont fait l'objet d'un séchage dans une étuve réglée à 60 °C pendant une demi-heure après quoi ces huiles ont été stockées dans des flacons ombrés et conservés à 4 °C en vue de subir les analyses physico-chimiques.

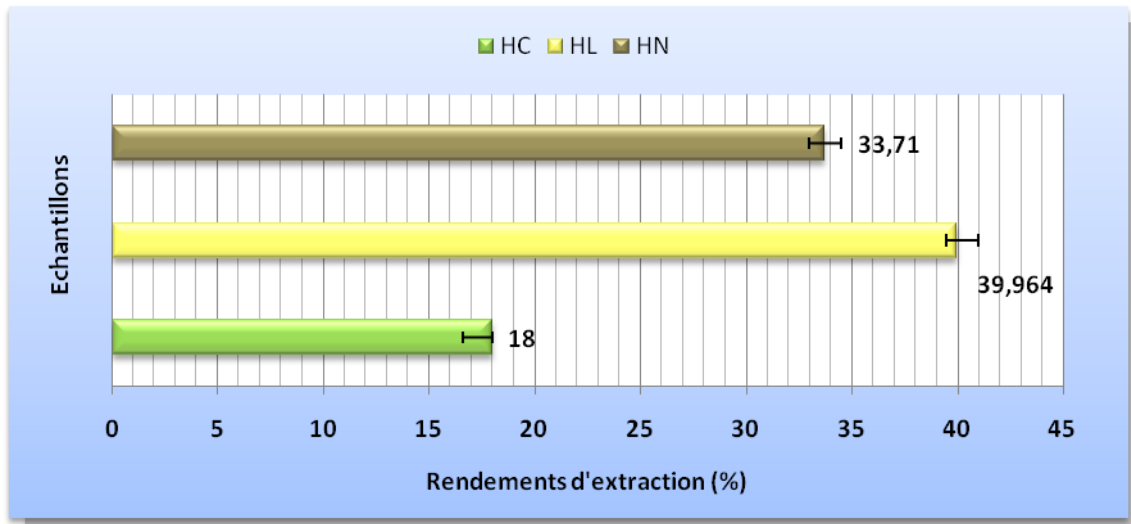


Figure 3.1 Valeurs moyennes des rendements des différents échantillons
HC : huile *Citrullus colocynthis* L. ; HL : huile *Linum usitatissimum*. L. ;
HN : huile *Nigella sativa* L.

3.2.2 Caractéristiques physico-chimiques des huiles

3.2.2.1 Caractéristiques physiques

a. Densité relative à t/20°C

Les valeurs de la densité des huiles prélevées à 20 °C sont comprises entre **0.909** et **0.9319**. Les résultats affichés sur la figure 3.2 montrent des valeurs de densité majoritairement proches à ceux des huiles végétales destinées à la consommation.

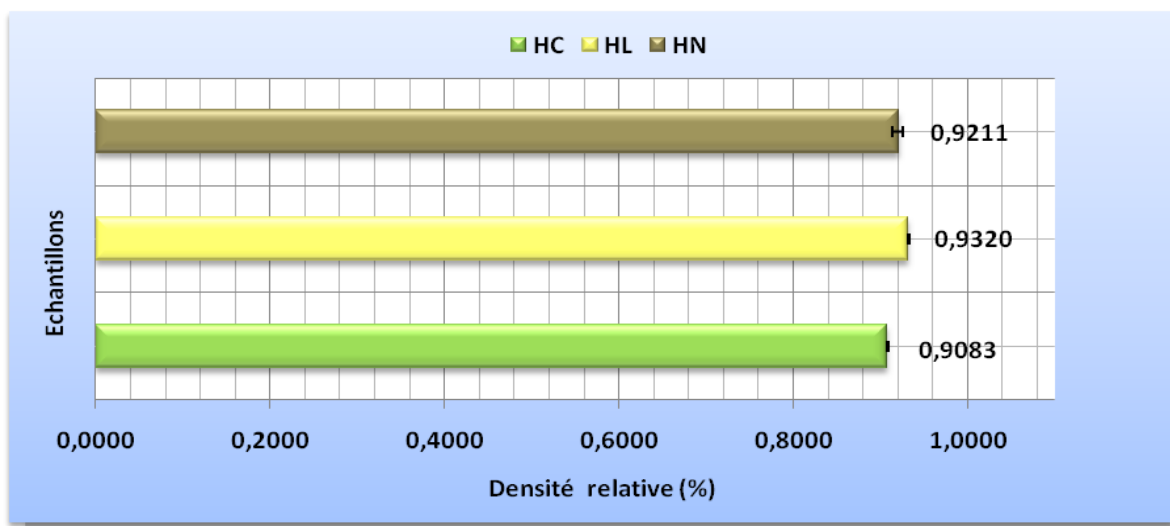


Figure 3.2 Résultats de la densité relative des différents échantillons
 HC : huile Citrullus colocynthis L. ; HL : huile de Linum usitatisimum. L. ;
 HN : huile de Nigella sativa L.

b. Indice de réfraction

L'indice de réfraction est un bon révélateur de la composition en acides gras majoritaires puis qu'il est fonction de l'insaturation présente sur ce corps gras. Les valeurs moyennes de l'indice de réfraction des trois huiles étudiées ont fluctué entre [1.4690 – 1.4775]. Cette plage d'indice est caractéristique des huiles végétales.

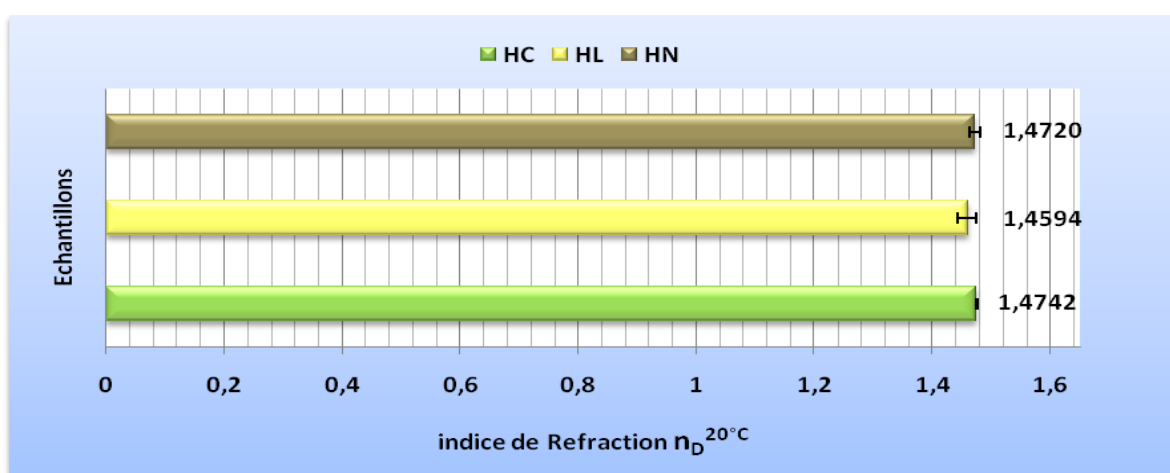


Figure 3.3 Valeurs moyennes des indices de réfraction des différents échantillons
 HC : huile Citrullus colocynthis L. ; HL : huile Linum usitatisimum.L. ;
 HN : huile Nigella sativa.L

c. Point de congélation

L'évaluation du point de congélation des fractions huileuses a révélé que l'huile de *Nigella sativa* a présenté la plus basse température de congélation ($- 7^{\circ}\text{C}$), suivi par l'huile de *Citrullus colocynthis* ($- 6^{\circ}\text{C}$) et l'huile de *Linum usitatisimum* ($- 4^{\circ}\text{C}$).

3.2.2.2 Caractéristiques chimiques

a. Etude de l'altération

L'analyse des indices d'altération renseigne sur la qualité organoleptique, nutritionnelle et le degré d'altération des huiles.

■ Acidité et indice d'acide

Les résultats de la figure 3.4, permettent de constater que l'huile de nigelle a présenté l'indice d'acide et une acidité nettement élevés [IA : 5.42 mg KOH/g, A : 3.81 %] par rapport aux deux autres huiles où leurs valeurs moyennes ont été respectivement [IA : 4.74 mg KOH/g, A : 2.03 %] et [IA : 1.85 mg KOH/g, A : 3.68 %] pour l'huile de Lin et huile de Coloquinte.

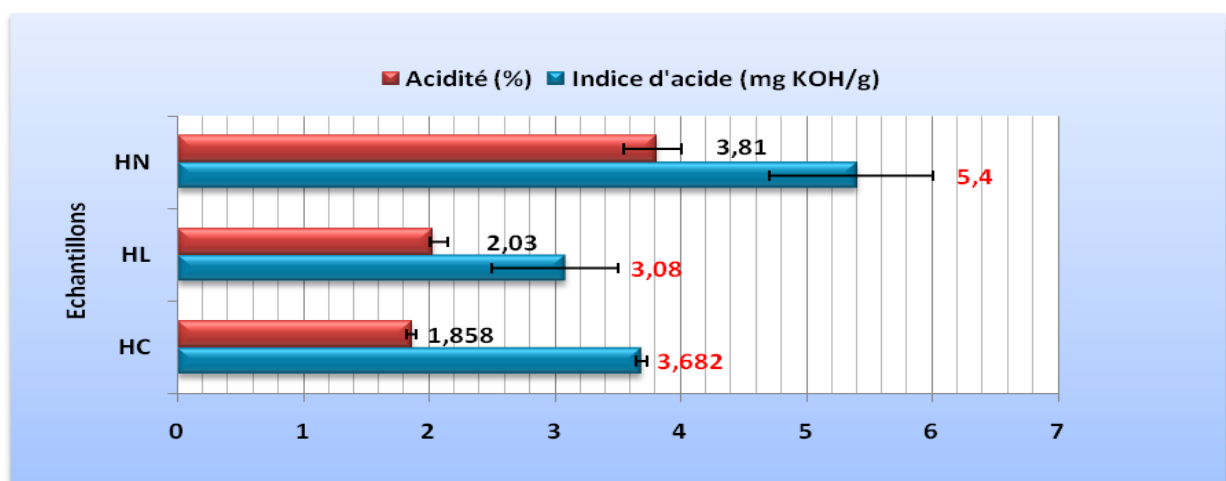


Figure 3.4 Valeurs moyennes de l'indice d'acide et de pourcentage de l'acidité des différents échantillons

HC : huile *Citrullus colocynthis* L. ; HL : huile *Linum usitatisimum* L. ;
HN : huile *Nigella sativa* L.

■ Indice de peroxyde

L'indice de peroxyde représente l'état d'oxydation d'un corps gras, il est exprimé en milliéquivalent d'oxygène actif par kilogramme d'acide gras, il renseigne sur la quantité d'oxygène présent dans un gramme d'acide gras et pouvant oxyder l'iodure de potassium.

La lecture des valeurs moyennes de l'indice de peroxyde illustrées dans la figure 3.5 montre un indice de peroxyde élevé pour l'huile de Nigelle (**6.02 Meqd'O₂ actif/kg de corps gras**). Les autres huiles ont eu des indices moins élevés respectivement (**4.7 Meqd'O₂ actifs/kg de corps gras** et **1.17 Meqd'O₂ actif/kg**) pour l'huile de lin et l'huile de coloquinte.

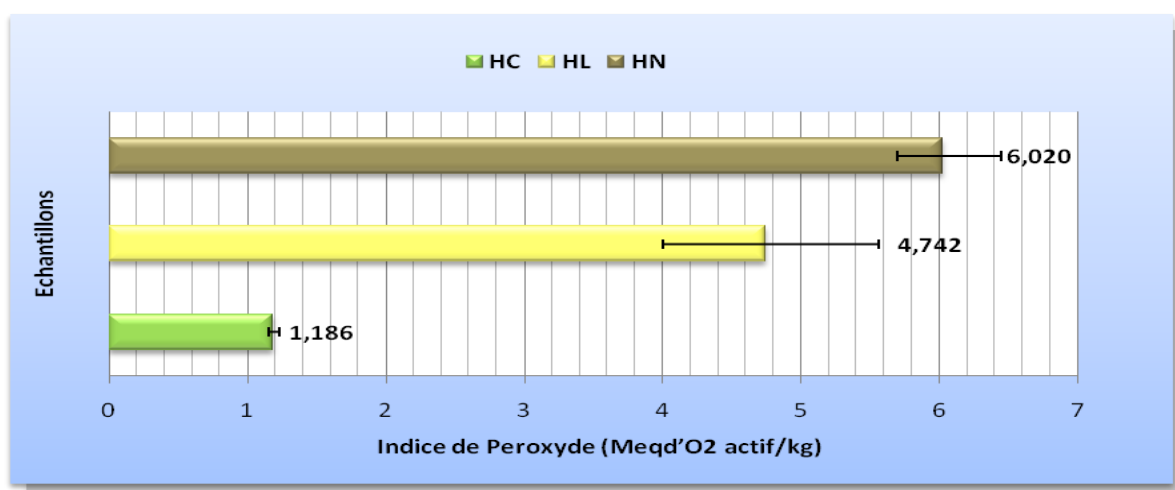


Figure 3.5 indice de peroxyde des différents échantillons
 HC : huile *Citrullus colocynthis* L. ; HL : huile *Linum usitatissimum*. L. ;
 HN : huile *Nigella sativa* L.

b. Etude des acides gras et des glycérides

■ Indice de saponification

L'indice de saponification renseigne sur la taille ou bien la longueur de la chaîne hydrocarbonée de l'acide gras en question. Il est exprimé en milligrammes de potasse capable de saponifier 1 gramme d'acide gras.

Les différentes valeurs moyennes de l'indice de saponification obtenues pour les trois huiles étudiées et consignées dans la figure 3.6 sont les suivantes : [191, 194.6 et 218.6 mg de KOH/g d'huile] respectivement pour l'huile de Lin, l'huile de Nigelle et l'huile de Coloquinte.

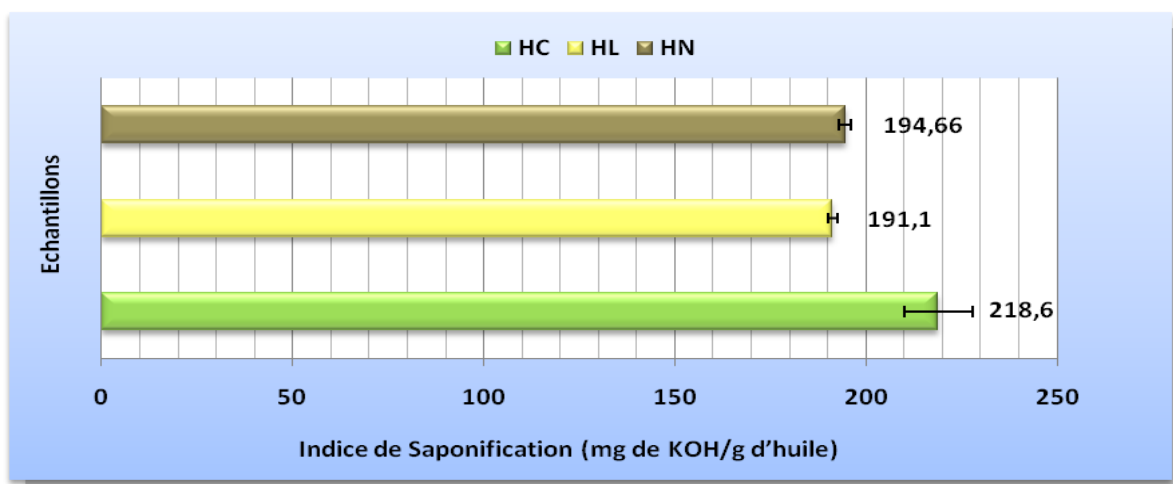


Figure 3.6 Valeurs moyennes de l'indice de saponification des différents échantillons

HC : huile *Citrullus colocynthis*. L. ; HL : huile *Linum usitatisimum*. L.
HN : huile *Nigella sativa*. L

■ Indice d'iode

Cet indice renseigne sur le degré d'insaturation du corps gras. La détermination se fera par quantification du nombre de grammes d'iode fixer par 100 g de corps gras.

Les résultats se rapportant à l'indice d'iode sont représentés dans la figure 3.7, qui montre une variabilité de cet indice. Les valeurs révélées montrent que les indices sont de l'ordre de : **85.5 gI₂/100g** pour l'huile de *Citrullus colocynthis*, par contre cet indice a été de l'ordre de **125.72** et **191.8 gI₂/100g** respectivement pour huile de *Linum usitatisimum* et l'huile de *Nigella sativa*.

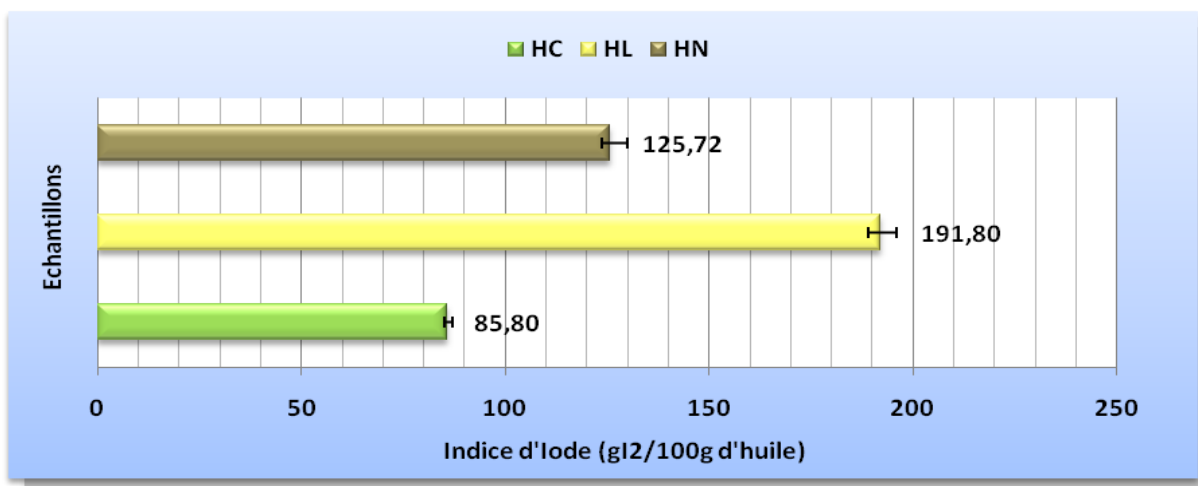


Figure 3.7 Indice d'iode des différents échantillons
 HC : huile *Citrullus colocynthis* L. ; HL : huile *Linum usitatisimum*. L. ;
 HN : huile *Nigella sativa* L.

c. Etude des constituants non glycéridiques

■ Teneur en matières insaponifiables

L'insaponifiable est la fraction résiduelle représentée par la partie non glycéridique de l'huile. Cette fraction est riche en métabolites secondaires (du cholestérol, des phytostérols, de l'ergostérol, des pigments, des vitamines, des hydrocarbures, etc.).

Les teneurs moyennes en matières insaponifiables illustrées sur la figure 3.8 révèlent un taux en insaponifiables variables pour les huiles étudiées. [**Ins. Lin** : 1.734% - **Ins. Col** : 2.26% - **Ins. Nig** : 3.47%].

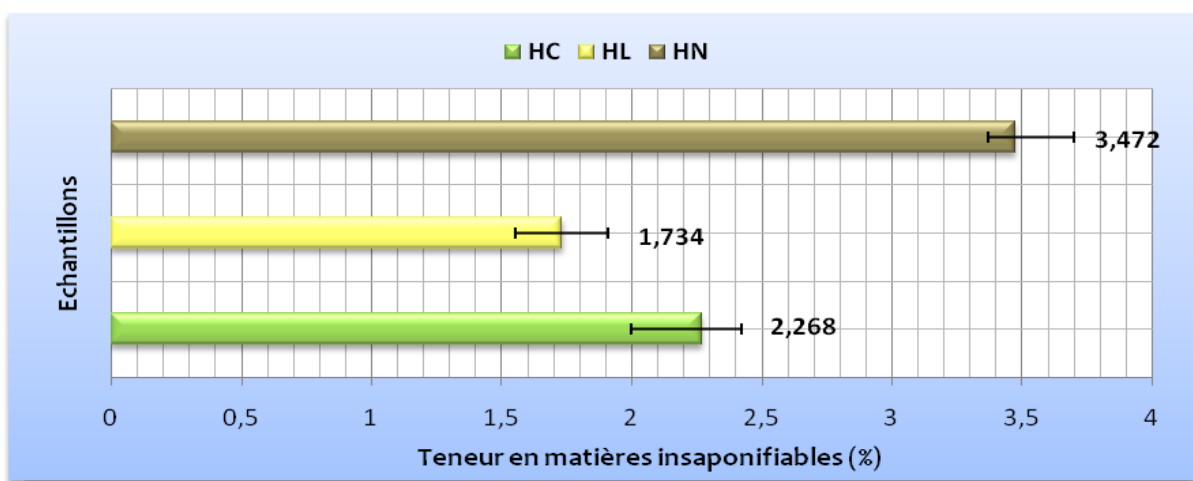


Figure 3.8 Valeurs moyennes de la teneur en matières insaponifiables des Différents échantillons

HC : huile *Citrus colocythis* L. ; HL : huile *Linum usitatissimum*. L.

HN : huile *Nigella sativa* L.

Tableau 3.1 Récapitulation de la caractérisation physico-chimique des huiles

Huiles	HC	HL	HN
pourcentage (%)	18	39.96	33.71
couleur	Jaune Clair	Jaune Paille	Marron verte
Caractères physiques			
▪ Densité	0.9083	0.9319	0.921
▪ Indice de refraction (20°C)	1.4742	1.4595	1.4720
▪ point de congélation (°C)	-6°	-4°	-7°
Caractères chimiques			
▪ indice de Saponification (mg KOH/g)	218.6	191	195
▪ Indice d'iode	85.80	192	126
▪ Matière insaponifiable (%)	2.268	1.7	3.47
Caractères d'altération			
▪ indice d'acide (%)	3.682	3.08	5.42
▪ Acidité (%)	1.858	2.03	3.81
▪ indice de peroxyde (meq/Kg)	1.18	4.74	6.02

3.2.3 Etude viscosimétrique

Le comportement rhéologique d'une huile est souvent complexe en raison de l'influence de nombreux paramètres inhérents à la structure (tailles et organisation des gouttes et des molécules) ou aux composés chimiques utilisés.

L'étude viscosimétrique type ubbelhode renseigne sur les variations de la conformation d'auto-associations des macromolécules en solution. Les informations ainsi obtenues reflètent l'existence d'association soit intermoléculaire soit intramoléculaire. La variation de la viscosité avec la concentration a fait l'objet de nombreuses études et plusieurs modèles empiriques ou théoriques ont été proposés.

L'étude du comportement rhéologique des huiles (huile de *Citrullus colocynthis* L, huile de *Linum usitatissimum*. L et l'huile de *Nigella sativa* L.), ainsi que l'influence de la concentration sur leurs comportements rhéologiques représentés sur les figures 3.9, 3.10, 3.11, 3.12, 3.13 et 3.14 montrent une variation de la viscosité spécifique des solutions aux différentes températures. Ainsi plus la température augmente et plus la viscosité diminue.

Les courbes des figures ci-dessous représentent l'influence de la concentration sur le comportement rhéologique des huiles et des esters de *Linum usitatissimum*, de *Nigella sativa* et de *Citrullus colocynthis*). Ils montrent une variation de la viscosité spécifique des solutions sur une gamme de concentration de $7.03 \cdot 10^{-3}$ jusqu'à $1.5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml pour les huiles et pour les esters $1.77 \cdot 10^{-7}$ mg/ml jusqu'à $2.56 \cdot 10^{-2}$ mg/ml.

Nous remarquons dans la partie où $C=C^*$, qu'il y'a une différence de concentration spécifique C^* pour les huiles et les esters, le tableau suivant représente ces concentrations :

Tableau 3.2 Concentrations spécifiques C^* des huiles et des esters.

	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Nigella sativa</i>	<i>Citrullus colocynthis</i>
huiles	$5.63 \cdot 10^{-6}$ mg/ml	$1.5 \cdot 10^{-3}$ mg/ml	$1.41 \cdot 10^{-8}$ mg/ml
esters	$1.95 \cdot 10^{-6}$ mg/ml	$6.07 \cdot 10^{-5}$ mg/ml	$1.13 \cdot 10^{-3}$ mg/ml

Notre étude s'est élargie à la détermination des masses des chaînes macromoléculaires des huiles et des esters respectivement. Cette étude a porté sur la variation de la viscosité réduite des solutions sur une gamme de concentration de $7.03.10^{-3}$ jusqu'à $1.5.10^{-3}$ mg/ml pour les huiles et pour les esters $1.77.10^{-7}$ mg/ml jusqu'à $2.56.10^{-2}$ mg/ml.

Les tracés montrent une différence des masses des chaînes macromoléculaires. Nous avons observé une masse importante concernant l'huile de *Nigella sativa* et pour l'ester de *Linum usitatissimum*. Tableau 3.3

Tableau 3.3 Masses spécifiques des huiles et des esters.

	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Nigella sativa</i>	<i>Citrullus colocynthis</i>
huiles	$1.1.10^{-8}$ mg	$2.25.10^{-8}$ mg	$1.28.10^{-8}$ mg
esters	$11.5.10^{-5}$ mg	$3.5.10^{-5}$ mg	$0.5.10^{-5}$ mg

Notre étude s'est élargie à étudier le comportement rhéologique du mélange de différentes concentrations des huiles ainsi que les esters figures 3.15 et 3.16 l'étude viscosimétrique, nous a permis d'observer l'existence de deux zones successives, la première zone représentant le comportement de la première huile ou le premier ester, la deuxième zone représente le comportement rhéologique de la seconde huile ou ester présent dans le mélange.

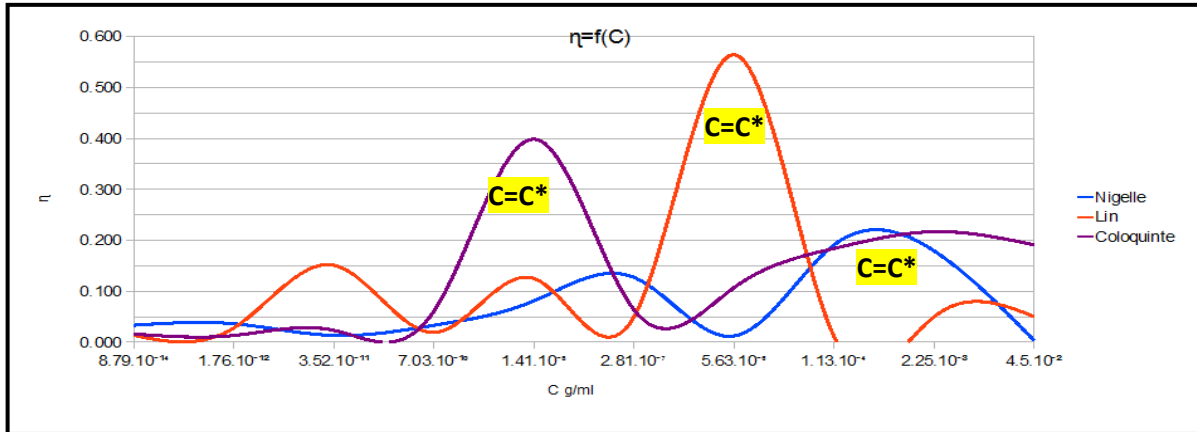


Figure 3.9 Viscosité spécifique η_{sp} des trois huiles en fonction de la concentration

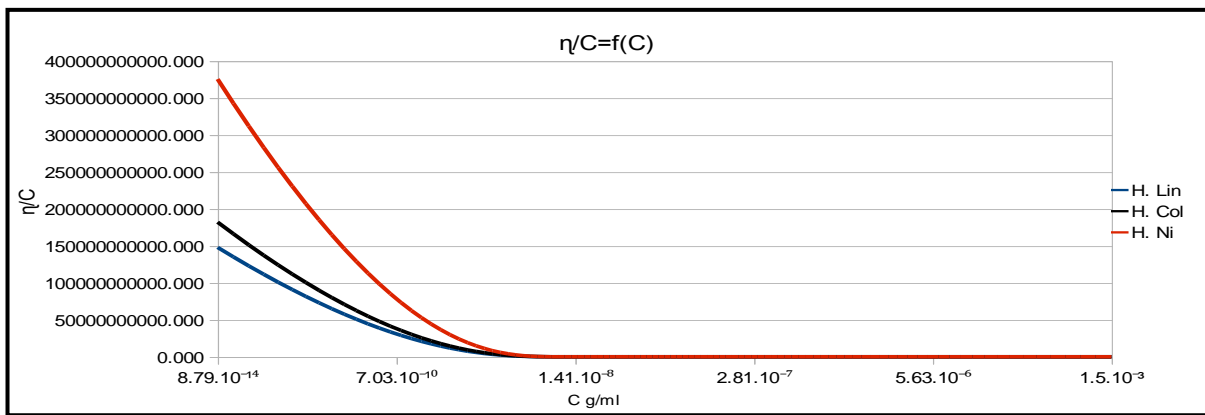


Figure 3.10 Viscosité réduite η_{red} des trois huiles en fonction de concentration

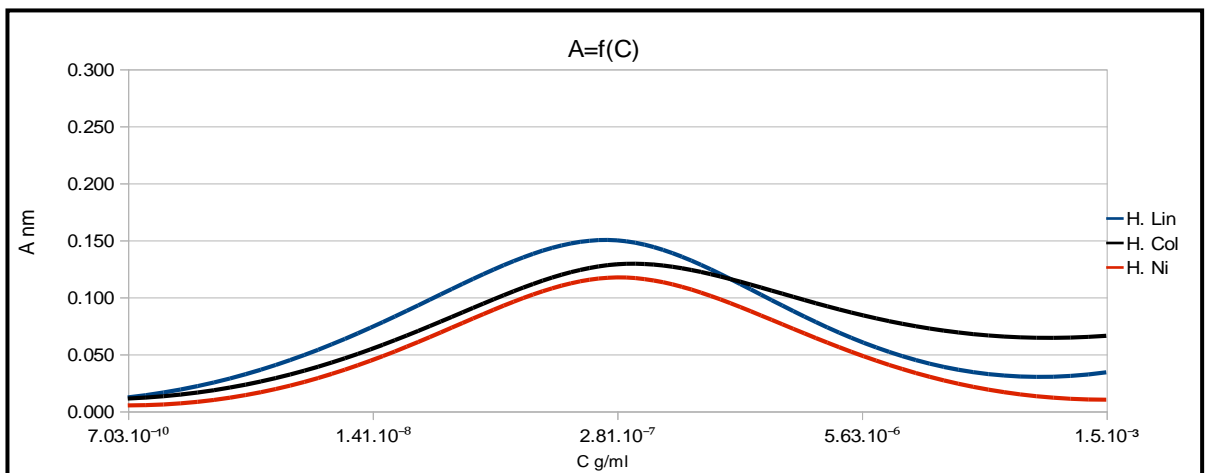


Figure 3.11 Absorbance des trois huiles en fonction de la concentration

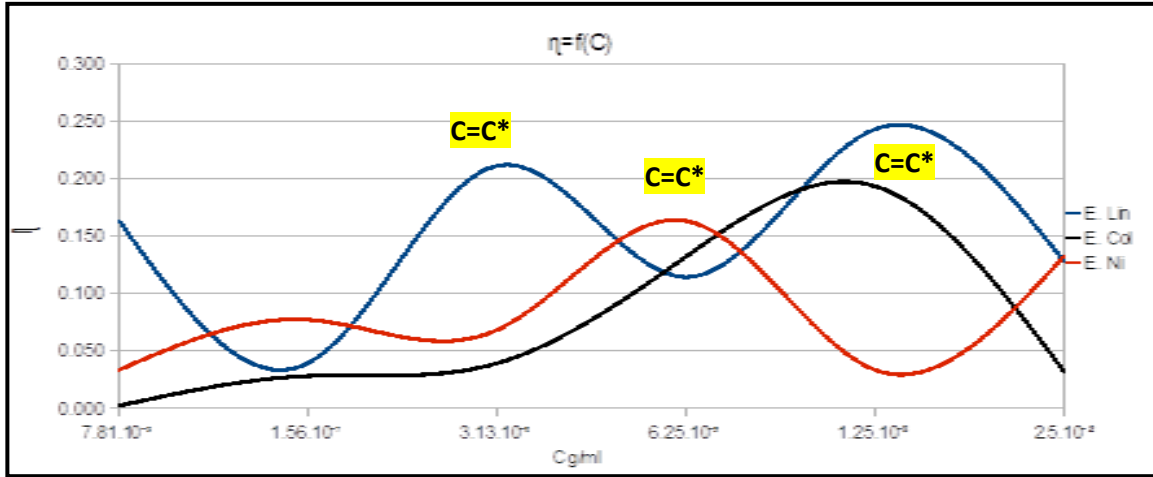


Figure 3.12 viscosité spécifique η_{sp} des trois esters en fonction de la concentration

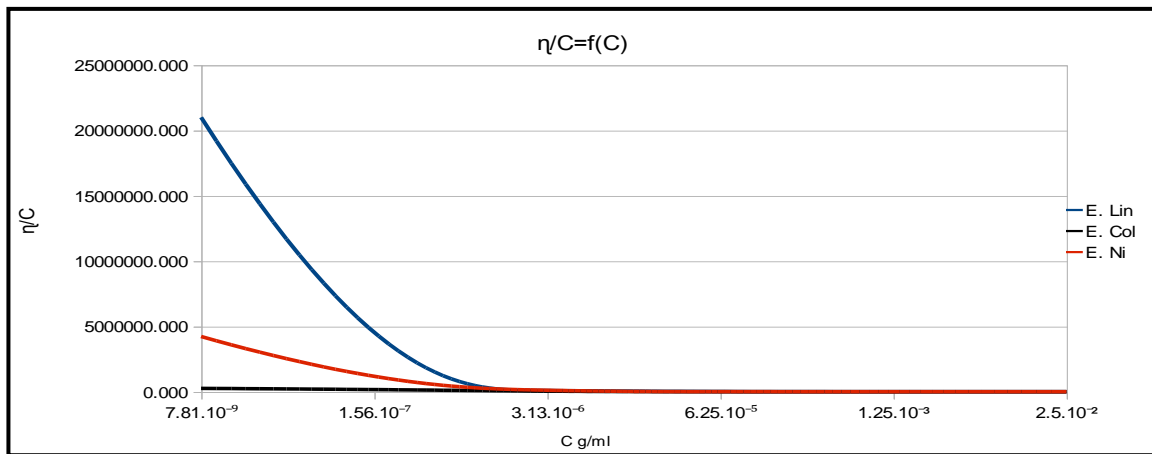


Figure 3.13 viscosité réduite η_{red} des trois esters en fonction de la concentration

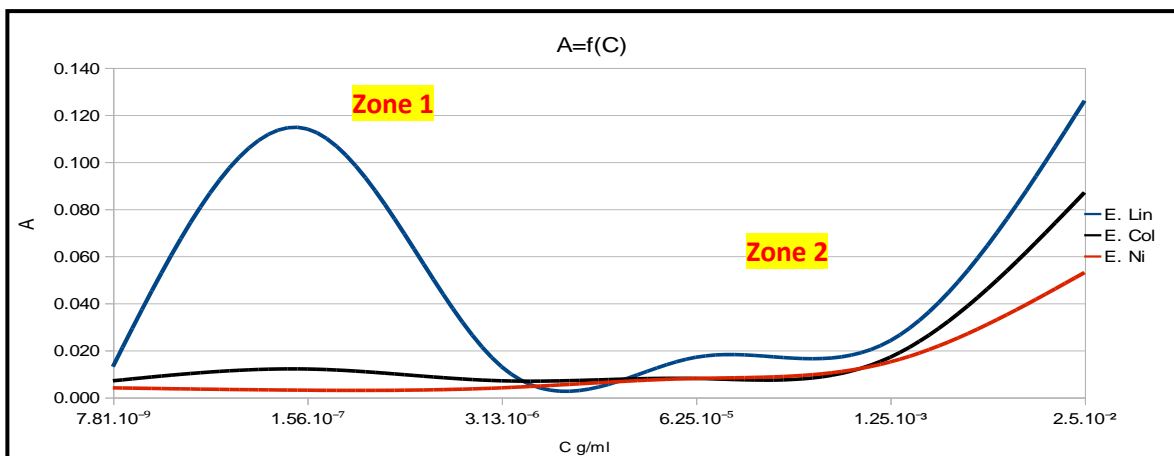


Figure 3.14 Absorbance des trois esters en fonction de la concentration

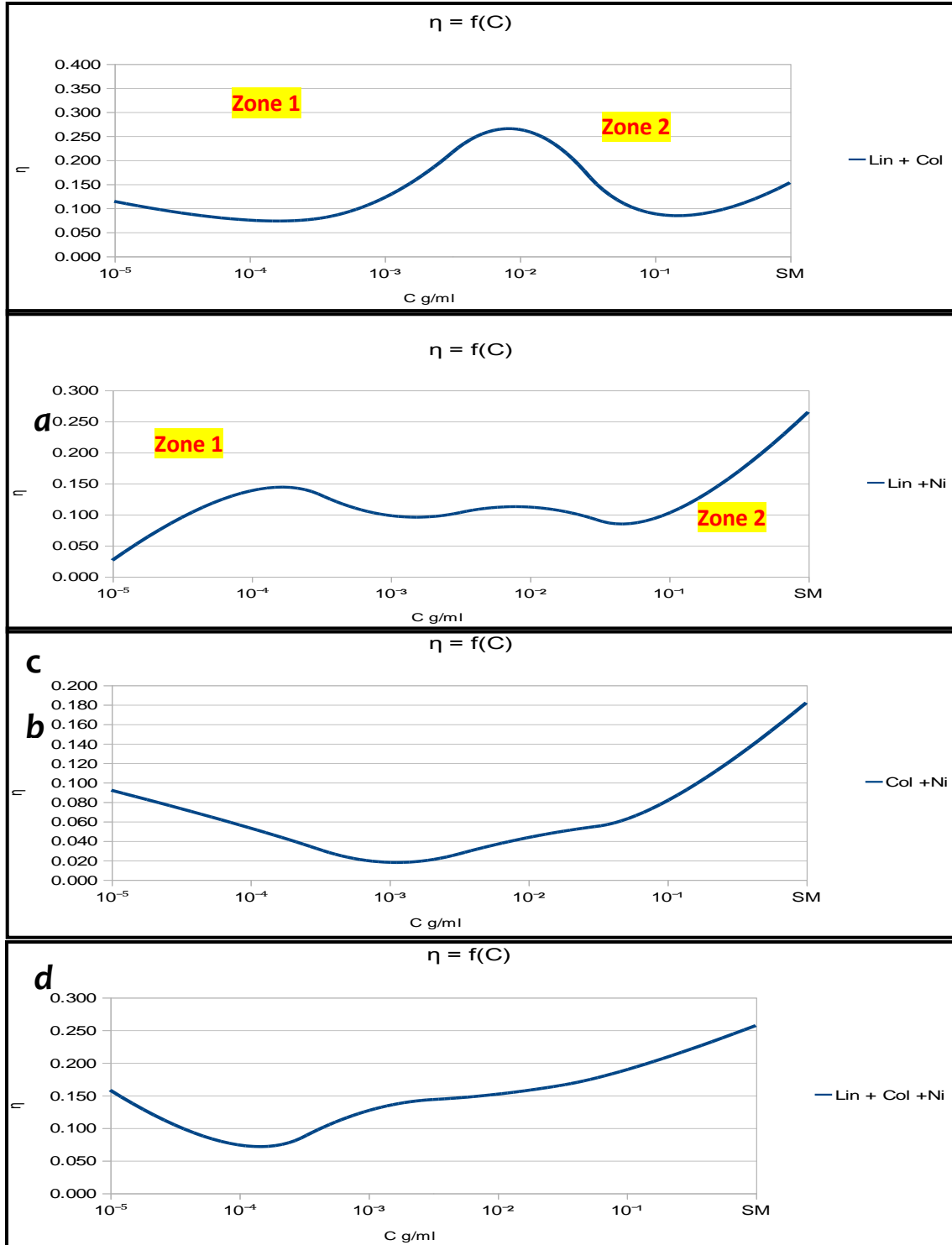


Figure 3.15 Tracés de la viscosité des combinaisons synergiques des huiles
a : synergie des huiles (Linum usitatissimum+ Citrullus colocynthis), **b** : synergie des huiles (Linum usitatissimum +Nigella sativa), **c** : synergie des huiles (Citrullus colocynthis +Nigelle sativa), **d** : synergie des huiles (Linum usitatissimum+ Citrullus colocynthis +Nigella sativa)

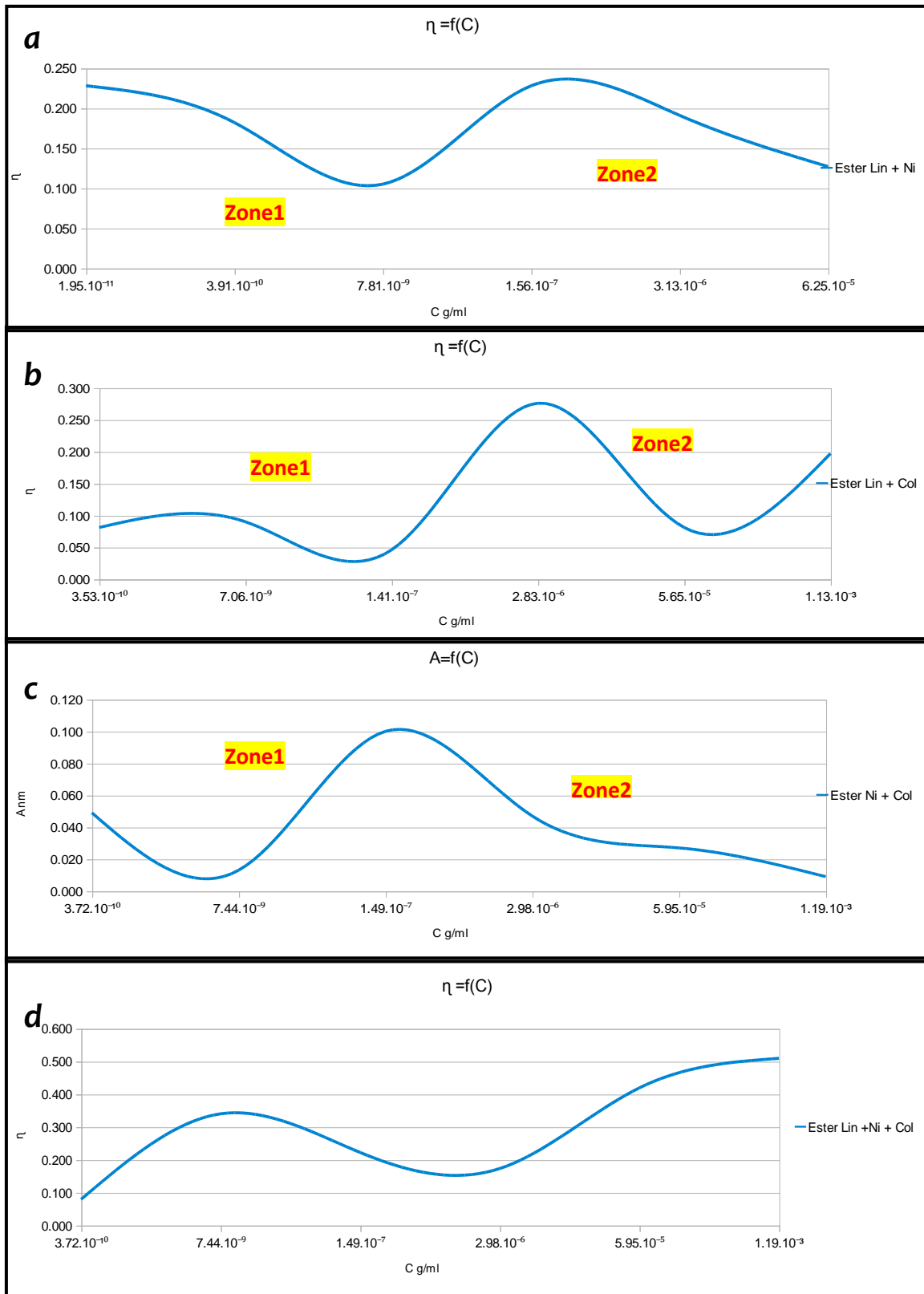


Figure 3.16 Tracés de la viscosité des combinaisons synergiques des esters

a : esters des huiles (*Linum usitatissimum*+ *Citrullus colocynthis*), **b** : esters des huiles (*Linum usitatissimum* +*Nigella sativa*), **c** : esters des huiles (*Citrullus colocynthis* +*Nigella sativa*), **d** : esters des huiles (*Linum usitatissimum*+ *Citrullus colocynthis* +*Nigella sativa*)

3.2.4 Analyses spectrales des l'huiles

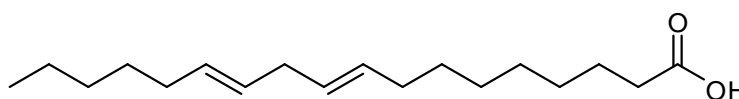
3.2.4.1 Analyse par CPG-MS

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) est une technique qui permet de séparer des molécules d'un mélange éventuellement très complexe de nature très diverses. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition. Les différentes molécules du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les unes après les autres après un certain laps de temps qui est en fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules.

D'autre part, la spectrométrie de masse (MS) est une technique physique d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse, et de caractériser leur structure chimique. Son principe réside dans la séparation en phase gazeuse de molécules chargées (ions) en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Elle est utilisée dans pratiquement tous les domaines scientifiques : physique, astrophysique, chimie en phase gazeuse, chimie organique, dosages, biologie, médecine.

a. Huile de *Citrullus colocynthis* L.

L'analyse du spectre CPG figures 3.17 - 3.18 montre la présence d'un produit majoritaire avec un temps de rétention $t = 9,72$ min plus de deux produits minoritaires vers $t = 6,20$ min et $t = 6,20$ min. L'analyse du spectre de masse du pic vers $t = 9,72$ min, révèle que ce produit est probablement l'acide linoléique.



Acide linoléique

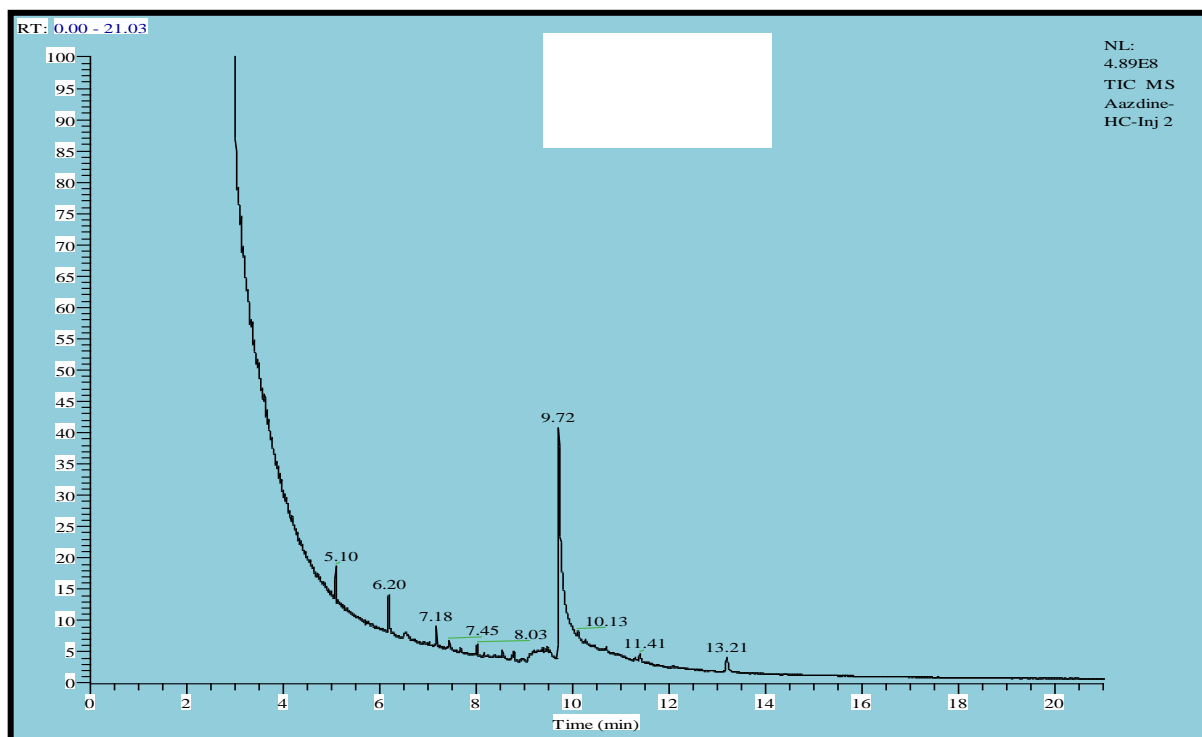


Figure 3.17 Spectre CPG de l'huile de Citrullus colocynthis L.

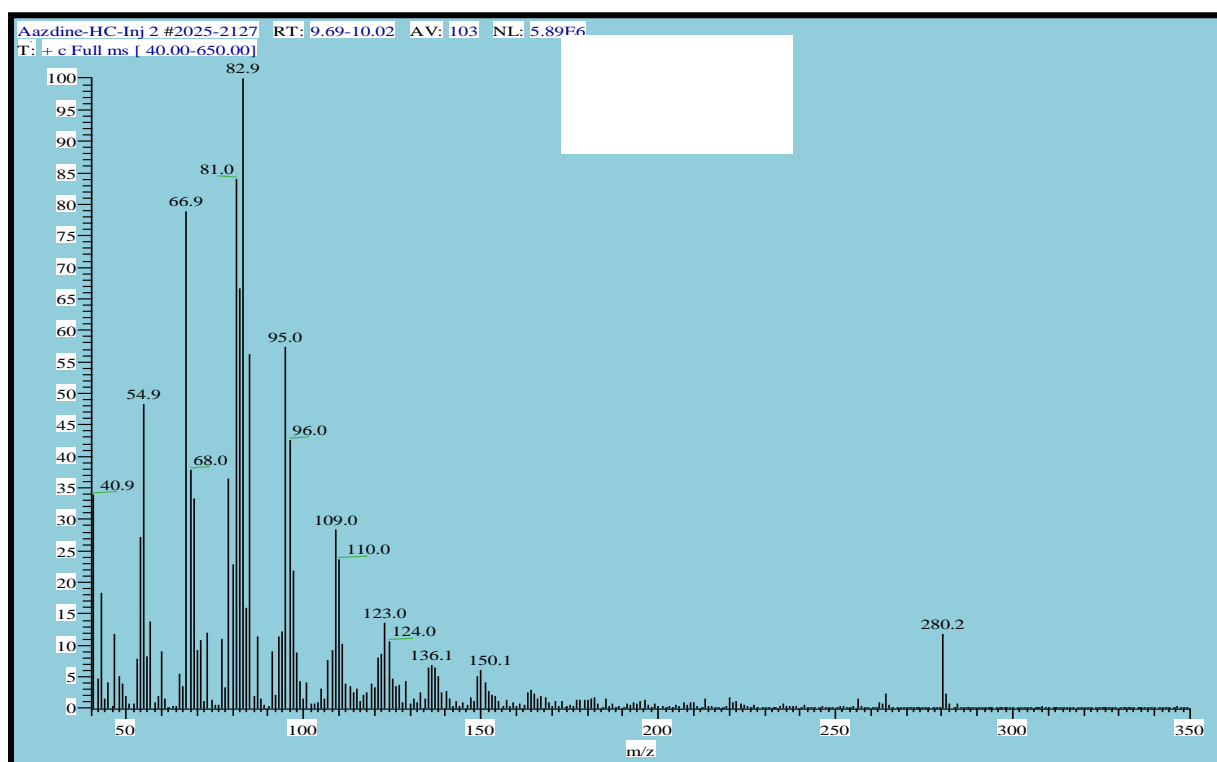


Figure 3.18 Spectre SM de l'huile de Citrullus colocynthis L.

b. Huile de *Linum usitatissimum* L.

De façon identique l'analyse du spectre CG de l'huile de *Linum usitatissimum* figures 3.19 - 3.20 montre la présence de quatre produits représentés par des pics à 6,20 ; 7,18 ; 8,03 et 10,13 min.

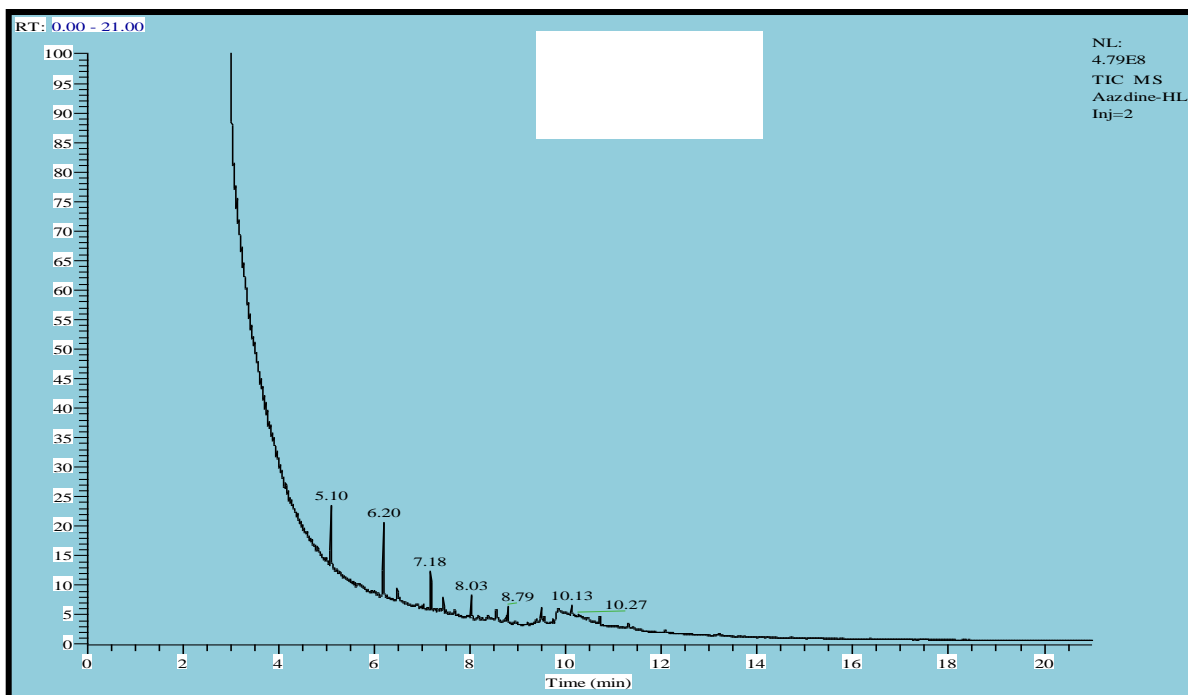


Figure 3.19 Spectre CPG de l'huile de *Linum usitatissimum* L.

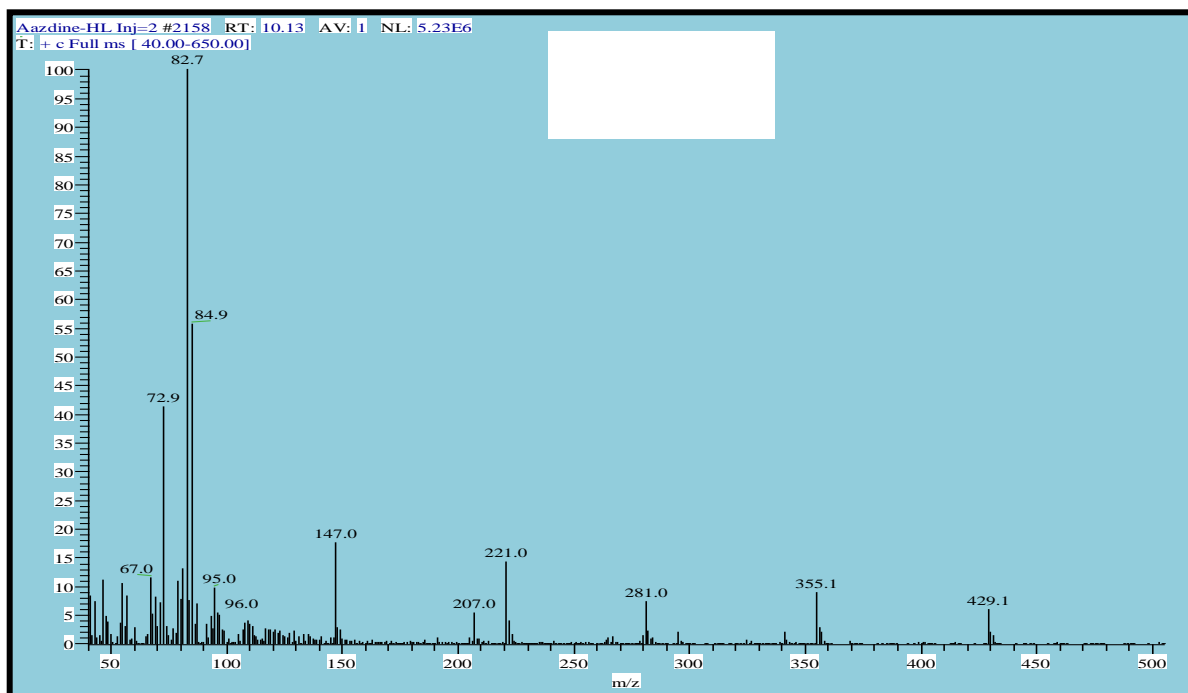


Figure 3.20 Spectre SM de l'huile de *Linum usitatissimum* L.

c. Huile de *Nigella sativa* L.

L'examen du spectre CG figure 3.20 – 3.21 de l'huile de *Nigella sativa* révèle que cette dernière contient plusieurs produits dont les plus importants sont à 6,20 ; 7,19 ; 9,50 et 9,76 min. L'analyse du pic situé à 9,76 min montre que ce dernier représente probablement l'acide linoléique.

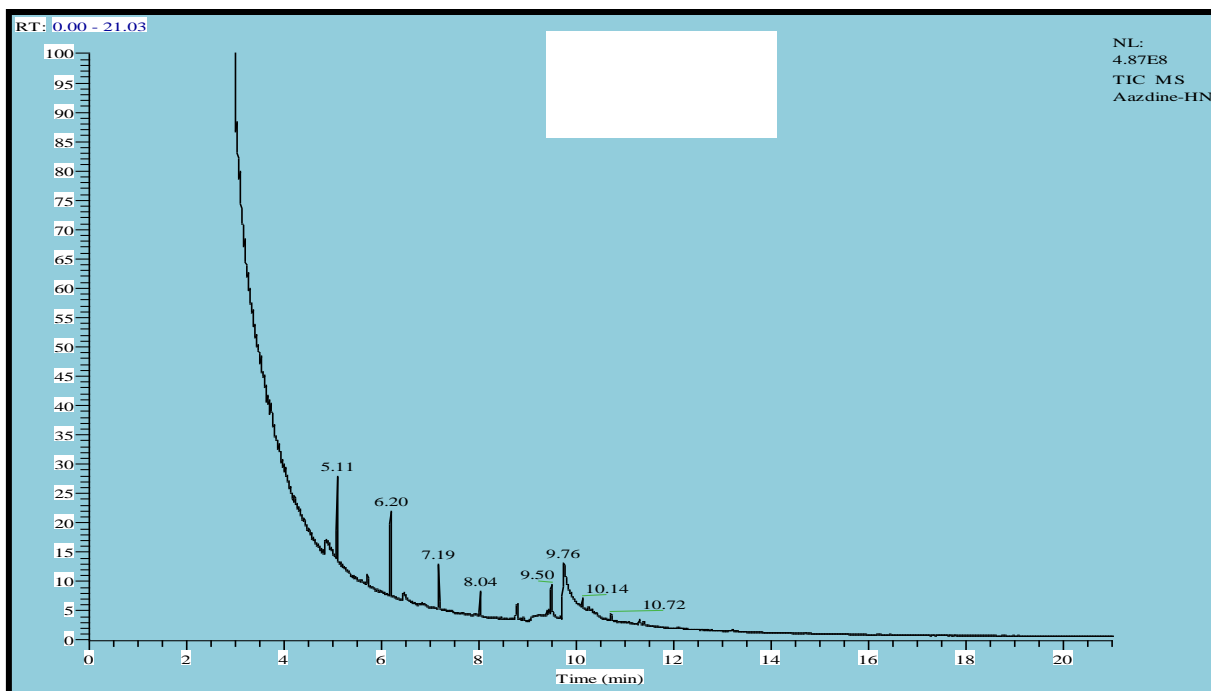


Figure 3.21 Spectre CPG de l'huile de *Nigella sativa* L.

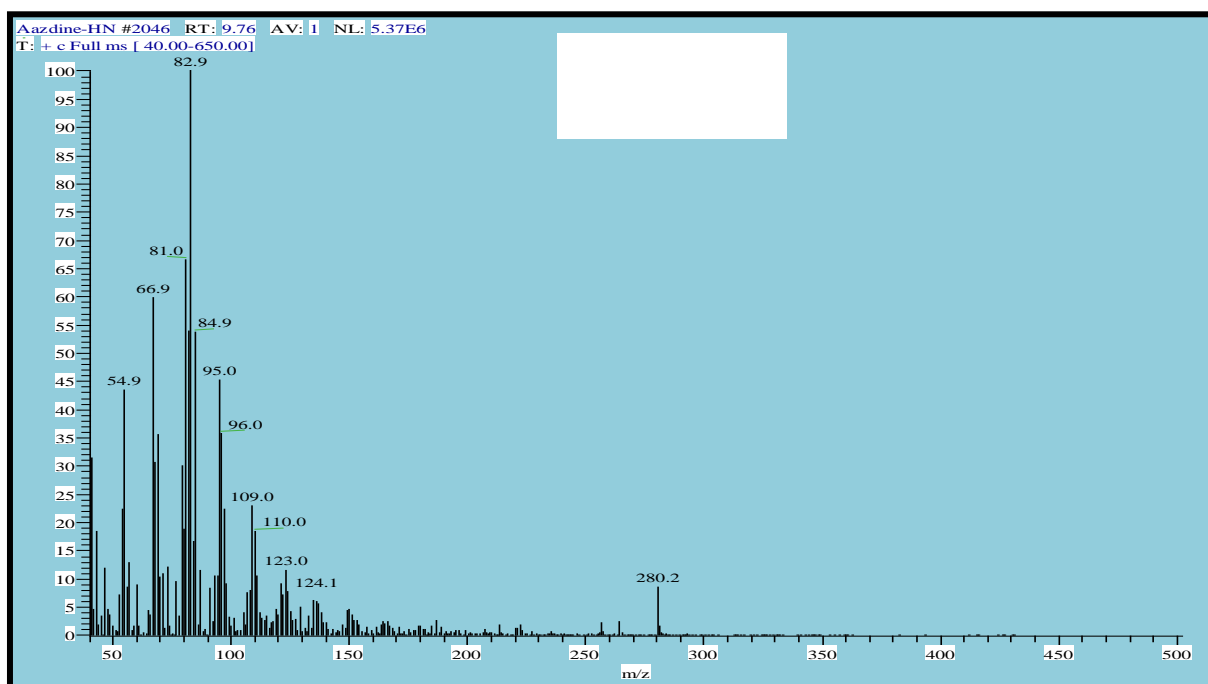


Figure 3.22 Spectre SM de l'huile de *Nigella sativa* L.

3.2.4.2 Analyse des huiles par Infrarouge (IR)

La spectroscopie infrarouge (parfois désignée comme spectroscopie IR) est une classe de spectroscopie qui traite de la région infrarouge du spectre électromagnétique. Elle recouvre une large gamme de techniques, la plus commune étant un type de spectroscopie d'absorption. Comme pour toutes les techniques de spectroscopie, elle peut être employée pour l'identification de composés via la détection des différentes fonctions organiques ou minérales. En générale l'analyse par infrarouge a permis de constater que nos huiles sont des mélanges d'acides et d'esters d'acides gras. Les spectres des huiles sont affichés sur la figure 3.23

a. Huile de *Citrullus colocynthis* L.

La lecture du spectre a permis de voir les régions spectrales suivantes :

- **3009,71 cm⁻¹**: cette région contient les vibrations fondamentales d'élongation des groupements =C-H_{cis}. L'intensité de l'absorption dans cette région est proportionnelle au nombre de doubles liaisons. Dans notre cas, et d'après le pic moyen de ce groupement, on conclut que notre produit contient plus de doubles liaisons.
- **2855; 2962,52; 2926 cm⁻¹**: cette partie du spectre est caractéristique des vibrations d'élongation du groupe C-H aliphatique. Deux bandes sont observables, une intense à 2926,52 cm⁻¹ et 2926 cm⁻¹ sont associées à l'élongation asymétrique du groupement CH₂ et CH₃. L'autre bande moins intense à 2855 cm⁻¹ est attribuée à l'élongation symétrique du groupe CH₂.
- **1743,37cm⁻¹**: cette élongation est attribuée au groupe C=O des esters.
- **1436,13 ; 1462,77 et 1362,67 cm⁻¹**: ces bandes sont attribuables respectivement aux vibrations de déformation des groupes CH₂ et CH₃.
- **1171,40 cm⁻¹**: cette bande est caractéristique aux vibrations d'élongation du groupe C-O ester. La bande du groupe C-O est en effet déplacée vers les basses fréquences sous l'influence de l'effet donneur inductif du groupement O-R.
- **1654 cm⁻¹**: ce pic est attribué à la vibration du groupe C=C. Donc cette bande confirme bien avec la bande de **3009,71 cm⁻¹** que notre produit contient de doubles liaisons C=C.

b. Huile de *Linum usitatissimum* L.

Les régions spectrales obtenues peuvent être divisées de la manière suivante :

- **3663,04 cm⁻¹** : cette bande correspond à la vibration d'allongement des OH des acides.
- **3008,47 cm⁻¹** : cette région contient les vibrations fondamentales d'élongation des groupements =C-H_{cis}. L'intensité de l'absorption dans cette région est proportionnelle au nombre de doubles liaisons. Dans notre cas, et d'après le pic moyen de ce groupement on conclut que notre produit contient plus de doubles liaisons.
- **2854,50 ; 2959,06 ; 2923,92 cm⁻¹** : cette partie du spectre est caractéristique des vibrations d'élongation du groupe C-H aliphatique. Deux bandes intenses à 2959,06 ; 2923,92 cm⁻¹ sont associées à l'élongation asymétrique du groupement CH₂ et CH₃. L'autre bande moins intense à 2854,50 cm⁻¹ est attribuée à l'élongation symétrique du groupe CH₂.
- **1657,13 cm⁻¹** : ce pic est attribué à la vibration du groupe C=C. Donc cette bande confirme bien avec la bande de **3008,47 cm⁻¹** que notre produit contient de doubles liaisons C=C.
- **1743,37 cm⁻¹** : cette élongation est attribuée au groupe C=O des esters.
- **1416,56 ; 1462,60 et 1378,17 cm⁻¹** : ces bandes sont attribuables respectivement aux vibrations de déformation des groupes CH₂ et CH₃.
- **1159,96 cm⁻¹** : cette bande est caractéristique aux vibrations d'élongation du groupe C-O de l'ester. La bande du groupe C-O est en effet déplacée vers les basses fréquences sous l'influence de l'effet donneur inductif du groupement O-R.

c. Huile de *Nigella sativa* L.

Les régions spectrales obtenues peuvent être divisées de la manière suivante :

- **3008,39 cm⁻¹** : cette région contient les vibrations fondamentales d'élongation des groupements =C-H_{cis}. L'intensité de l'absorption dans cette région est proportionnelle au nombre de doubles liaisons. Dans notre cas, et d'après le pic moyen de ce groupement on conclut que notre produit contient plus de doubles liaisons.
- **2853,95 ; 2923,22 cm⁻¹** : cette partie du spectre est caractéristique des vibrations d'élongations du groupe C-H aliphatique. Une bande intense à 2923,22 cm⁻¹ est associée à

l'élongation asymétrique du groupement CH_2 et CH_3 . L'autre bande moins intense à $2853,95 \text{ cm}^{-1}$ est attribuée à l'élongation symétrique du groupe CH_2 .

- **$1743,37 \text{ cm}^{-1}$** : cette élongation est attribuée au groupe $\text{C}=\text{O}$ des esters.
- **$1657,91 \text{ cm}^{-1}$** : ce pic est attribué à la vibration du groupe $\text{C}=\text{C}$. Donc cette bande confirme bien avec la bande de **$3008,39 \text{ cm}^{-1}$** que notre produit contient de doubles liaisons $\text{C}=\text{C}$.
- **$1417,85$; $1464,32$ et $1377,82 \text{ cm}^{-1}$** : ces bandes sont attribuables respectivement aux vibrations de déformation des groupes CH_2 et CH_3 .
- **$1160,14 \text{ cm}^{-1}$** : cette bande est caractéristique aux vibrations d'élongation du groupe $\text{C}-\text{O}$ ester. La bande du groupe $\text{C}-\text{O}$ est en effet déplacée vers les basses fréquences sous l'influence de l'effet donneur inductif du groupement $\text{O}-\text{R}$.

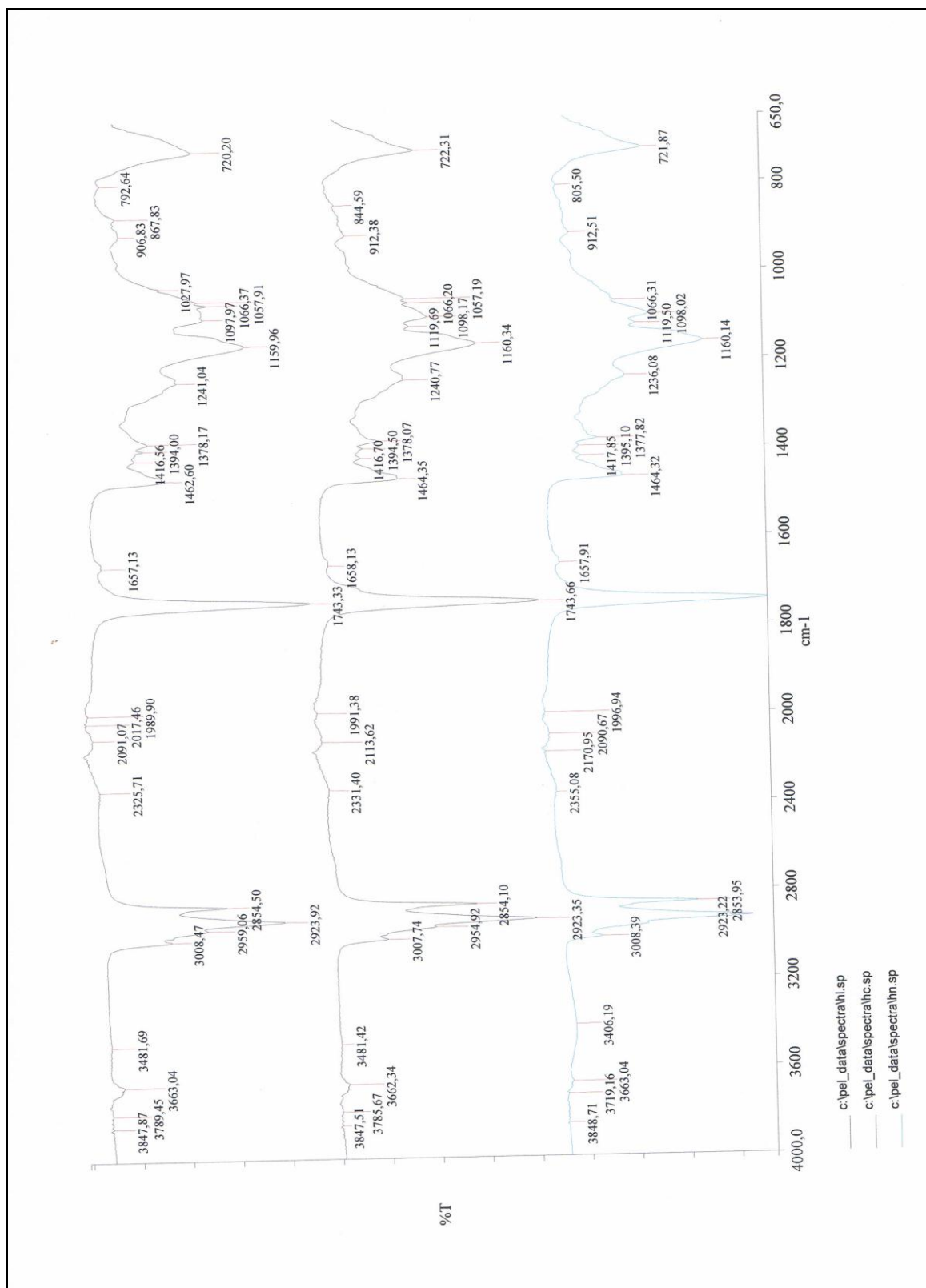


Figure 3.23 Spectres infrarouge des huiles de *Linum usitatissimum*, *L-Citrullus colocynthis* L - *Nigella sativa* L.

3.2.5 Séparation des esters

3.2.5.1 Rendements en esters

La lecture des résultats des rendements en esters bruts issus de l'estérification des trois huiles affichés dans la figure 3.24 révèle que ces rendements ont été très variables. Notons que l'ester brut de l'huile de Lin et celui de l'huile de Nigelle ont présenté les meilleurs rendements [37.44 %, 37.05 %] par rapport à l'ester de l'huile de coloquinte [29.02 %].

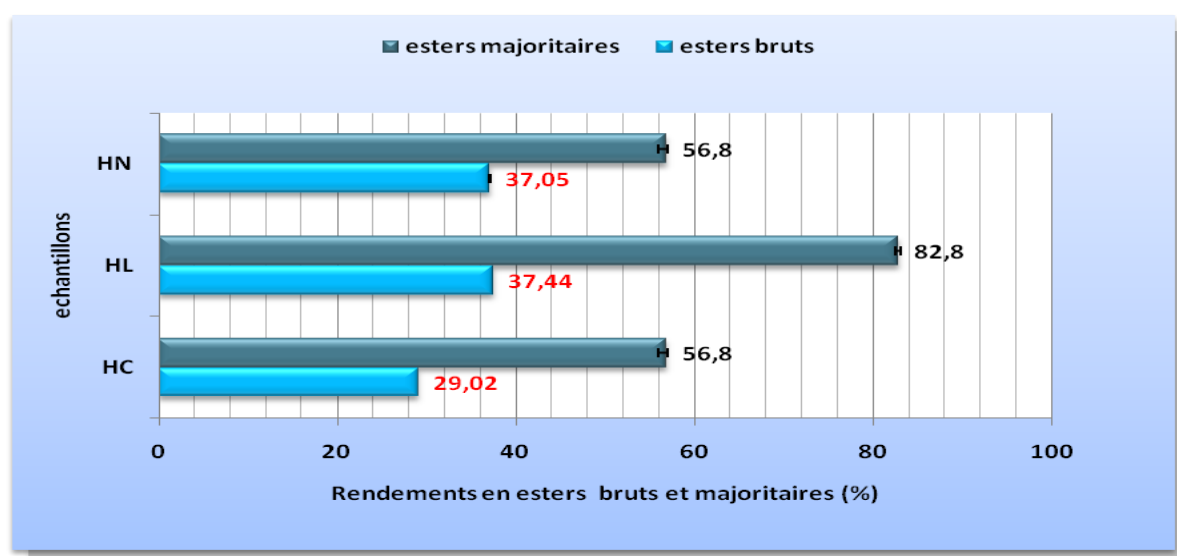


Figure 3.24 Valeurs moyennes des rendements en esters bruts et majoritaires des différents échantillons

HC : huile *Citrullus colocynthis* L. ; HL : huile *Linum usitatissimum*. L.

HN : huile *Nigella sativa* L.

3.2.5.2 Séparation chromatographique

a. Séparation sur couche mince (CCM)

La CCM est de loin la technique chromatographique la plus utilisée dans la séparation et l'isolement de divers composants présents dans un mélange peu ou pas complexe. Elle est aussi utilisée pour choisir le système éluant adéquat pour une meilleure séparation.

Les résultats de la séparation chromatographique sur couche mince de nos esters concrétisés par les photos des plaques CCM sur la figure 3.25 montrent que le meilleur système éluant permettant une bonne séparation des esters est [éther de pétrole/chloroforme : 8/2 et 7/3].

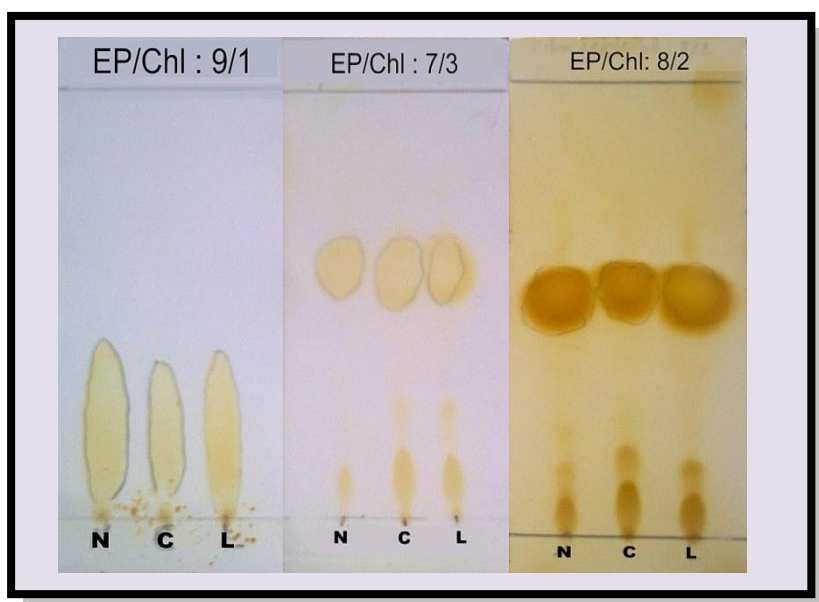


Figure 3.25 chromatographie sur couche mince des esters bruts des différents échantillons HC : huile *Citrullus colocynthis* L. ; HL : huile *Linum usitatissimum* L. ; HN : huile *Nigella sativa* L.

b. Séparation sur colonne

Les rendements moyens en esters majoritaires issus de la séparation sur colonne des esters bruts des trois huiles (système d'éluion **éther de pétrole/chloroforme [6/4]**) montrent de meilleurs rendements en esters majoritaires supérieurs à 80 % fournis par les esters bruts de

Linum usitatisimum et ceux de *Nigella sativa*. [R^{dt} Lin : 82.80%, R^{dt} Nig : 81.03 %]. Le rendement en ester majoritaire issu de *Citrullus colocynthis* à été moins important [R^{dt} Col : 81.03 %].

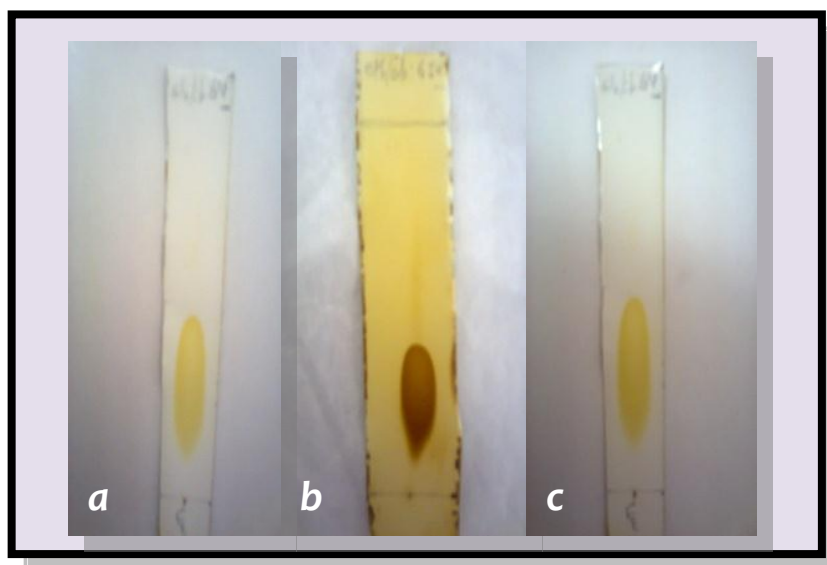


Figure 3.26 chromatographie sur couche mince des esters majoritaires des différents échantillons
a : ester majoritaire *Linum usitatisimum*, **b** : ester majoritaire *Citrullus colocynthis*, **c** : ester majoritaire *Nigella sativa*

3.2.5.3 Analyses spectrales des esters méthyliques d'acides gras libres (FAMEs) issues des huiles

a. Analyse par chromatographie gaz (CPG)

Les profils des fractions des esters méthyliques d'acides gras libres (FAMEs) extraites des différentes huiles étudiées ont révélé la présence de quatre pics avec des temps de rétention différents. Le temps de passage réel des différentes fractions a été généralement de 10 à 11 minutes. Les fractions d'esters méthyliques d'acides gras ont été identifiées par les temps relatifs par rapport à ceux connus en utilisant une banque de données NBS et la bibliothèque WILEY pour l'identification spectroscopique de masse.

Le temps de passage réel des différentes fractions FAME's isolés à partir de l'huile *Citrullus colocynthis* L. a été généralement de 11 minutes. L'analyse du spectre CG figure 3.27 des différentes fractions montrent en général des pics situés à 8.63, 9.48 et 9.62 minutes. Ces pics correspondraient le plus souvent aux esters méthyliques des acides gras respectifs : palmitique, α -linoléique, linoléique et stéarique.

L'analyse du chromatogramme de la fraction FAMEs isolée de l'huile de *Linum usitatissimum* L. montre un temps de passage de 10 minutes, comme indiqué sur la lecture du spectre GC montre trois pics avec des temps de rétention à 8.63-9.55 et 9.62 min caractéristique selon la comparaison aux bases de données aux esters méthyliques caractéristiques des acides palmitique, α -linoléique, linoléique et stéarique. figure 3.28.

L'exploitation des résultats du chromatogramme CG de la fraction FAMEs isolée à partir de l'huile de *Nigella sativa* L. affichée par la figure 3.29, renseigne les mêmes informations que les fractions précédentes. Exception faite par la présence d'un pic à 10.32 minutes ainsi que le temps de passage qui a été de 11 minutes.

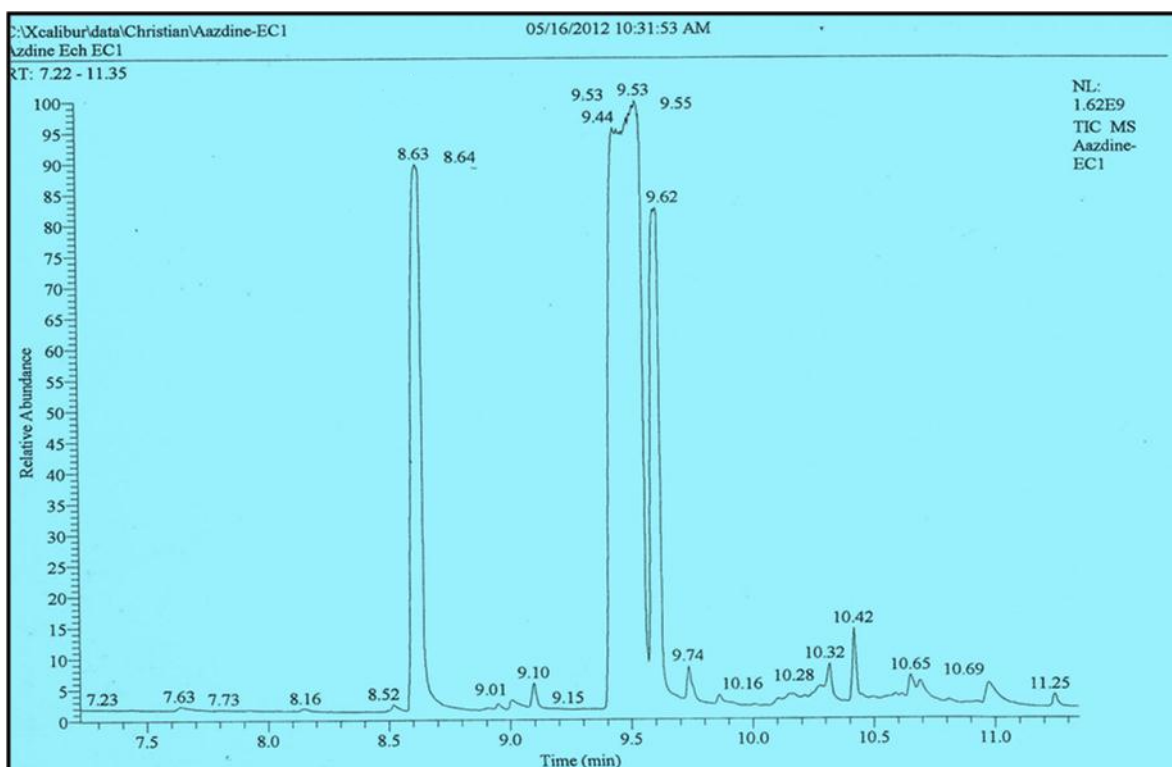


Figure 3.27 Spectre CG de la fraction majoritaire d'esters méthyliques (FAMEs) isolés de l'huile de *Citrullus colocynthis* L.

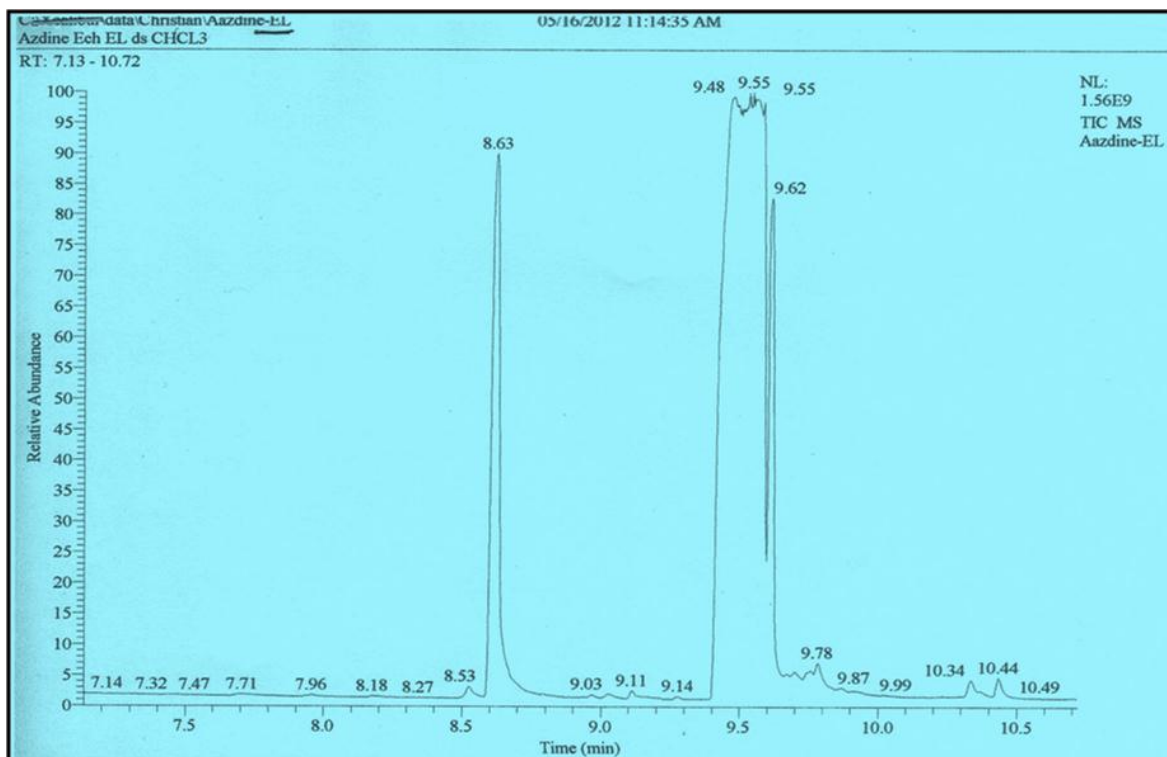


Figure 3.28 Spectre CG de la fraction majoritaire d'esters méthyliques (FAMES) isolés de l'huile de *Linum usitatissimum* L.

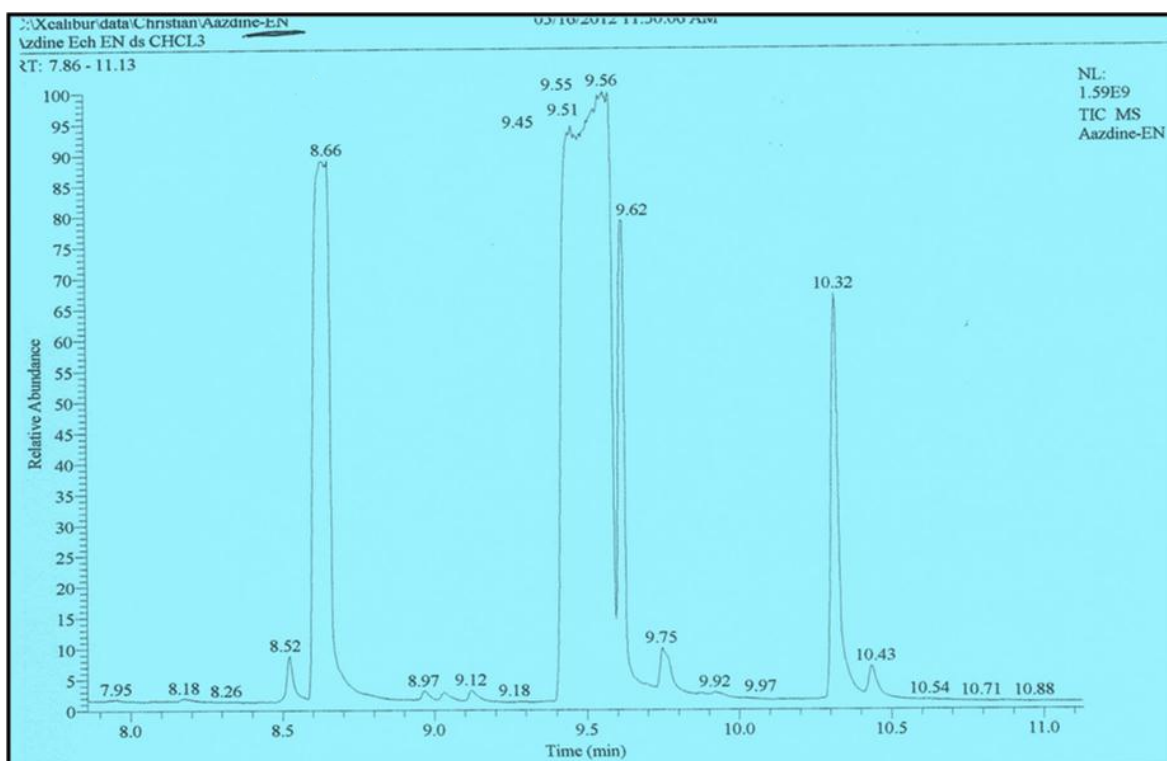


Figure 3.29 Spectre GC de la fraction majoritaire d'esters méthyliques (FAMES) isolés de l'huile *Nigella sativa* L.

b. Analyse par spectroscopie de masse (SM)

■ FAMES isolées à partir de l'huile de *Citrullus colocynthis* L.

La lecture du spectre de masse du pic à 8,63 min, a révélé la présence de l'ion moléculaire à $m/z = 270$. Par ailleurs, les spectres de masse des esters méthyliques non ramifiés FAME (ester méthylique de l'acide palmitique) sont caractérisés par des fragments ioniques à $m/z = 74$ (réarrangement McLafferty), $m/z = 87$ (coupure en β), et $[M - 31]$ (perte de OMe). D'autres fragments ioniques $[M - C_nH_{2n+1}]$ (227, 185, 143, 129, proviennent du clivage de la chaîne alkyle saturée non ramifiée on été enregistrés. figure 3.30

L'ester méthylique d'acide α -linoléique (figure 3.31) a un ion moléculaire abondant ($m/z = 292$) et des ions hydrocarbonés de formule générale $[C_nH_{2n-5}]^+$ ayant une tendance à dominer le spectre de l'ion à $m/z = 78,8$ comme le pic de base. Un pic à $m/z = 150$ attribué aux esters méthyliques d'acides gras polyinsaturés $[C_{11}H_{13}]^+$, tandis que l'un à $m/z = 108$ est attribué au groupe terminal $[C_8H_{13}]^+$. En outre, l'on note la présence des ions formée par un clivage similaire à l'extrémité du carboxyle donnant un fragment contenant les deux premières doubles liaisons et le deuxième groupe méthylène (moins un proton) que l'on pourrait appeler coupure "alpha". L'ion correspond sur le spectre au méthyle 9, 12, 15-octadecatrenoate est à $m/z = 236$.

L'analyse des données de la figure 3.31, révèle que l'ester méthylique d'acide linoléique a un ion moléculaire abondant à ($m/z = 294$) et un ion résiduel dû à la perte de l'ion McLafferty ($m/z = 220$), bien que l'ion McLafferty ($m/z = 74$) ait une abondance faible. Le pic à $m/z = 263,1$ correspond à la fragmentation $[M-31]^+$. Les ions d'hydrocarbonés de formule générale $[C_nH_{2n-3}]^+$ dominant dans la gamme inférieure de masse ($m/z = 67, 81, 95, 109, 123, \text{etc.}$).

La lecture du spectre de masse du pic à 9,62 min confirme que le composé correspondant est l'ester méthylique de l'acide stéarique. Les résultats de la figure 3.32 ont révélé le pic de l'ion moléculaire à $m/z = 298$, les fragments ioniques à $m/z = 74$ (réarrangement McLafferty), la perte de OMe ($m/z = 267$), (le clivage en β) à $m/z = 87$ et les fragments d'ions $[M - C_nH_{2n+1}]^+$ à ($m/z = 255, 241, 213, 199, 185, 157, 143, 129$ et 101).

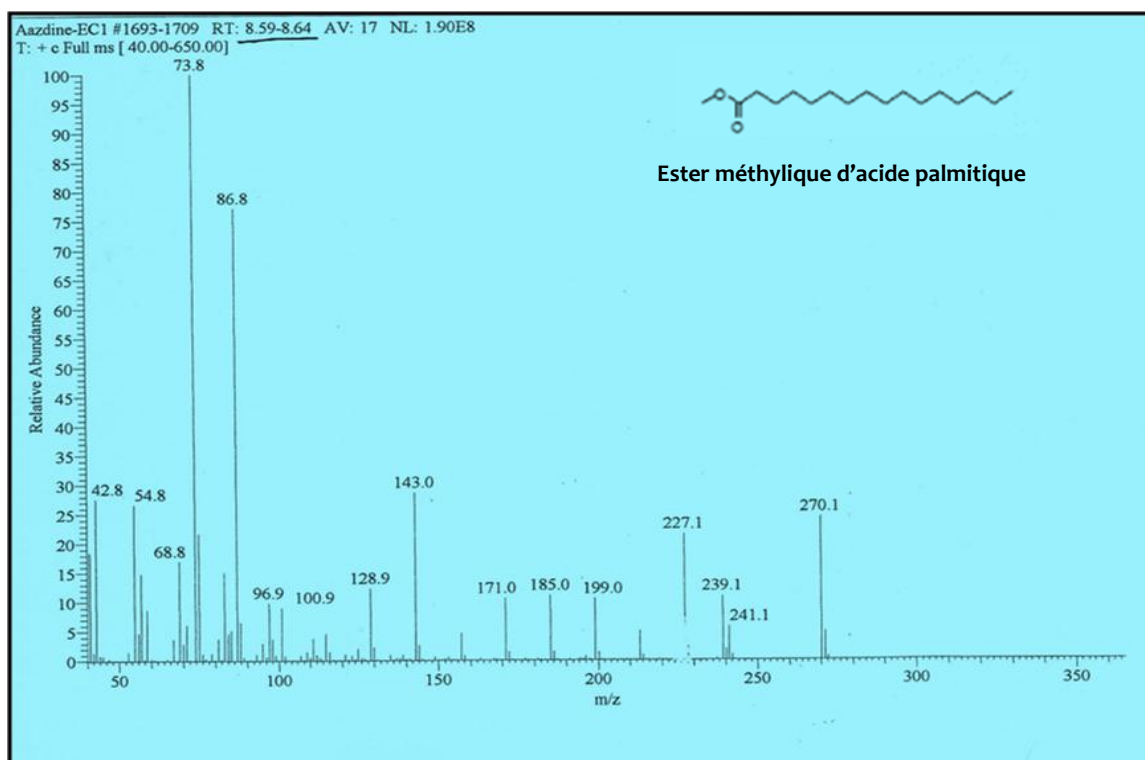


Figure 3.30 Spectre MS de l'ester méthylique d'acide palmitique isolé de l'huile de *Citrullus colocynthis* L. (pic à 8.63 minutes).

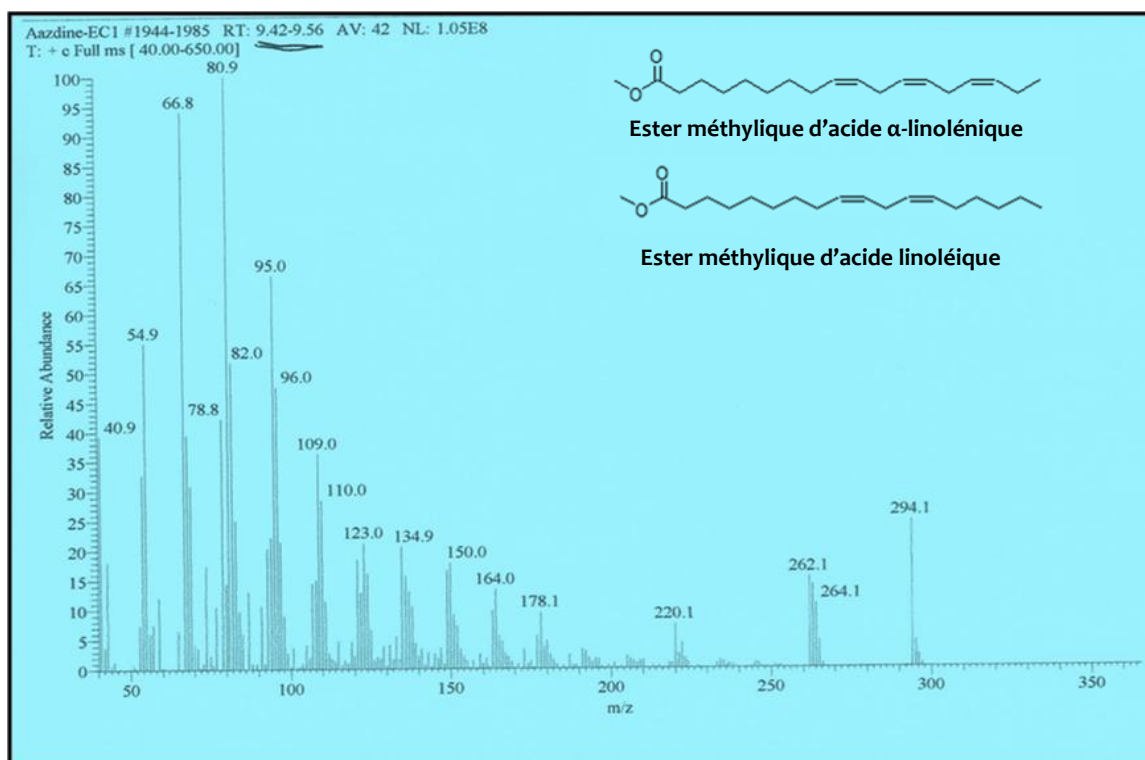


Figure 3.31 Spectre MS des esters méthyliques d'acides α -linoléique et linoléique isolés de l'huile de *Citrullus colocynthis* L. (pics à 9.48-9.53 minutes)

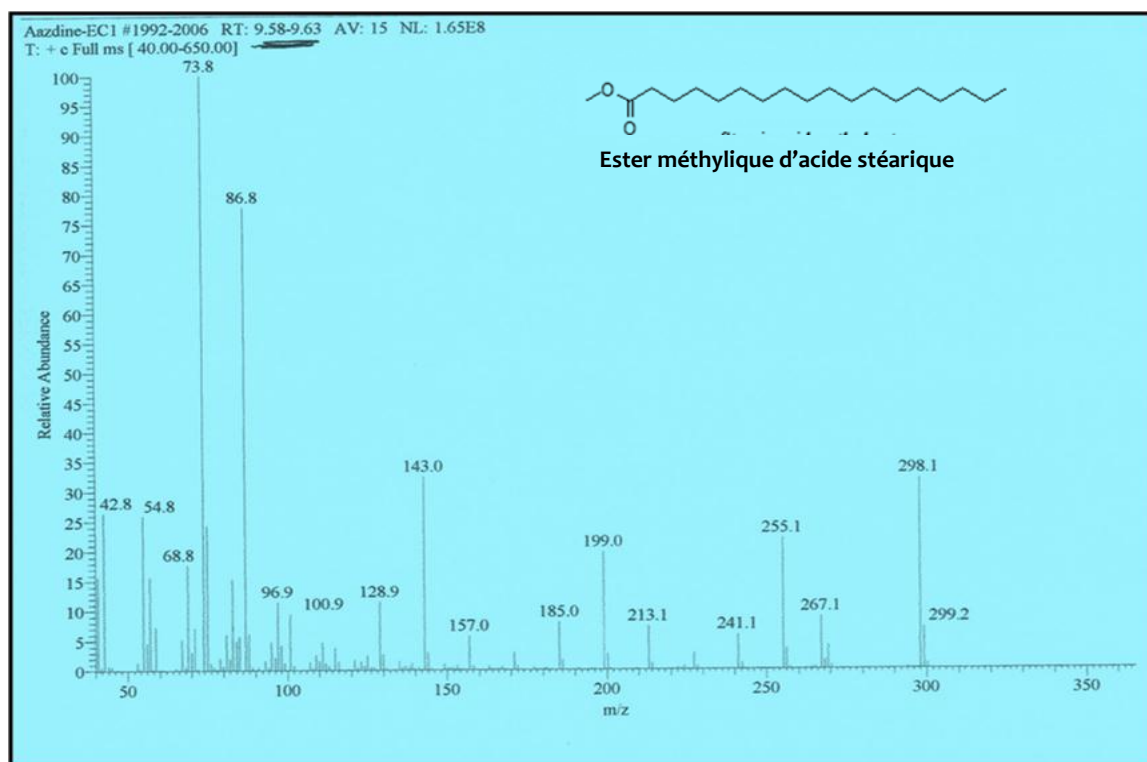


Figure 3.32 Spectre MS de l'ester méthylique d'acide stéarique isolé de l'huile de *Citrullus colocynthis* L. (pic à 9.62 minutes).

■ FAMES isolées à partir de l'huile de *Linum usitatissimum* L.

La lecture du spectre de masse du pic à 8,63 min, a révélé la présence de l'ion moléculaire à $m/z = 270$. Par ailleurs, les spectres de masse des esters méthyliques non ramifiés FAME (ester méthylique de l'acide palmitique) est caractérisé par des fragments ioniques à $m/z = 74$ (réarrangement McLafferty), $m/z = 87$ (coupure en β), et $[M - 31]$ (perte de OMe). D'autres fragments ioniques $[M - C_n H_{2n+1}]$ (227, 185, 143, 129) proviennent du clivage de la chaîne alkyle saturée non ramifiée. figure 3.33.

L'ester méthylique d'acide α -linoléique a un ion moléculaire abondant ($m/z = 292$) et des ions hydrocarbonés de formule générale $[C_nH_{2n-5}]^+$ ayant une tendance à dominer le spectre de l'ion à $m/z = 78,8$ comme le pic de base. Un pic à $m/z = 150$ qui est caractéristique des esters méthyliques d'acides gras polyinsaturés $[C_{11}H_{13}]^+$, tandis que l'un à $m/z = 108$ définit le groupe terminal $[C_8H_{13}]^+$. En outre, l'on note la présence des ions formés par un clivage similaire à l'extrémité carboxyle de la molécule donnant un fragment contenant les deux premières doubles liaisons et le deuxième groupe méthylène (moins un proton) que l'on pourrait appeler "coupure alpha". L'ion correspondant dans le spectre de méthyl 9, 12, 15-octadécatriénoate est à $m/z = 236$. Cet ion a été étudié de manière plus systématique par des méthodes d'ionisations chimiques dans un document par d'autres qui semble avoir été en grande partie négligé.

Comme l'illustre la figure 3.34, l'ester méthylique d'acide linoléique a un ion moléculaire abondant à ($m/z = 294$) et un ion résiduel dû à la perte de l'ion McLafferty ($m/z = 220$), bien que l'ion McLafferty ($m/z = 74$) soit faible. Le pic à $m/z = 263,1$ correspond à la fragmentation $[M-31]^+$. Les ions d'hydrocarbonés de formule générale $[C_nH_{2n-3}]^+$ dominent dans la gamme inférieure de masse ($m/z = 67, 81, 95, 109, 123, \text{etc.}$).

L'élucidation du spectre de masse du pic à 9,62 min confirme que le composé correspondant est l'ester méthylique de l'acide stéarique. Les résultats ont révélé que le pic de l'ion moléculaire à $m/z = 298$, les fragments ioniques à $m/z = 74$ (réarrangement McLafferty), la perte de OMe ($m/z = 267$), (le clivage en β) $m/z = 87$ et le fragment d'ions $[M - C_nH_{2n+1}]^+$ à ($m/z = 255, 241, 213, 199, 185, 157, 143, 129$ et 101).figure 3.35

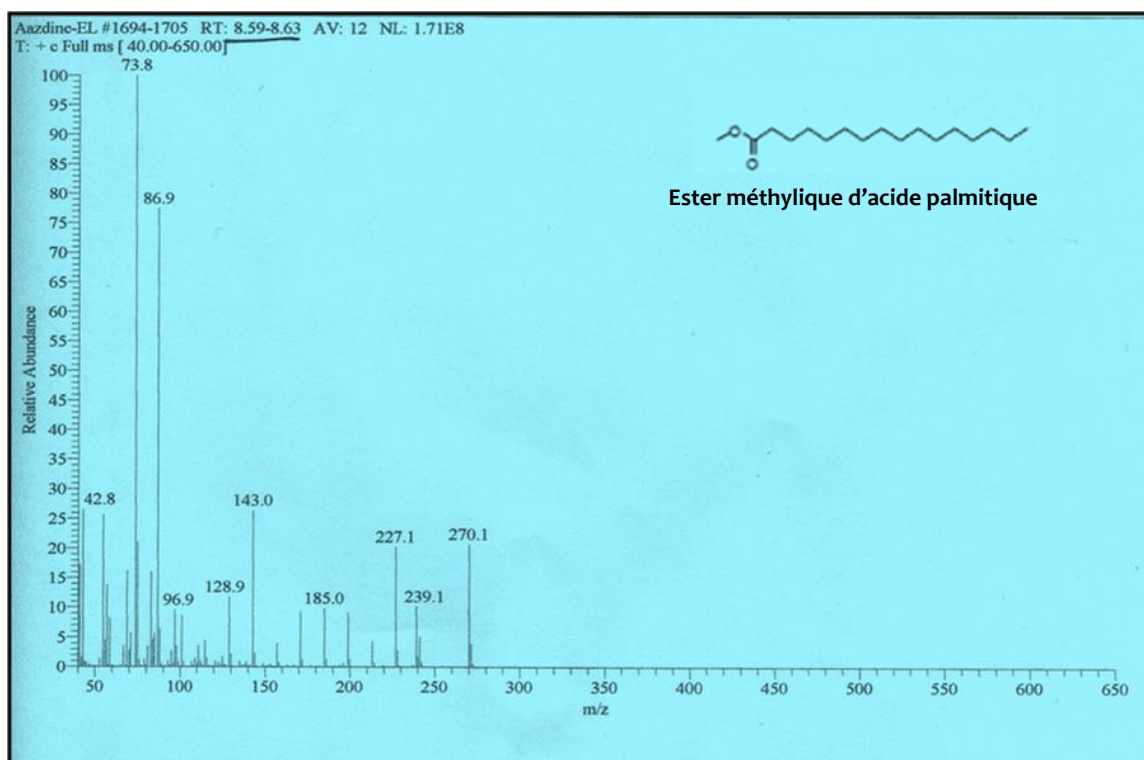


Figure 3.33 Spectre MS de l'ester méthylique d'acide palmitique isolé de l'huile isolé de l'huile de *Linum usitatissimum* L. (pic à 8.63 minutes).

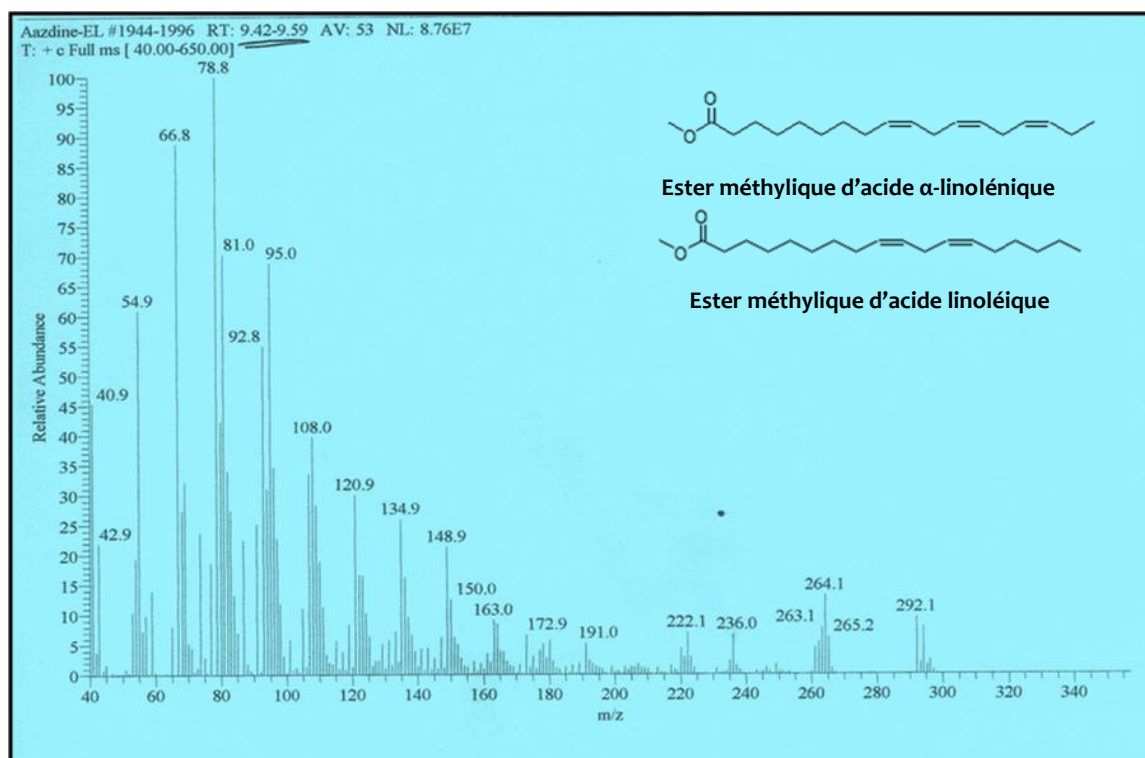


Figure 3.34 Spectre MS des esters méthyliques d'acides α-linolénique et linoléique isolés de l'huile de *Linum usitatissimum* L. (pics à 9.48-9.55 minutes)

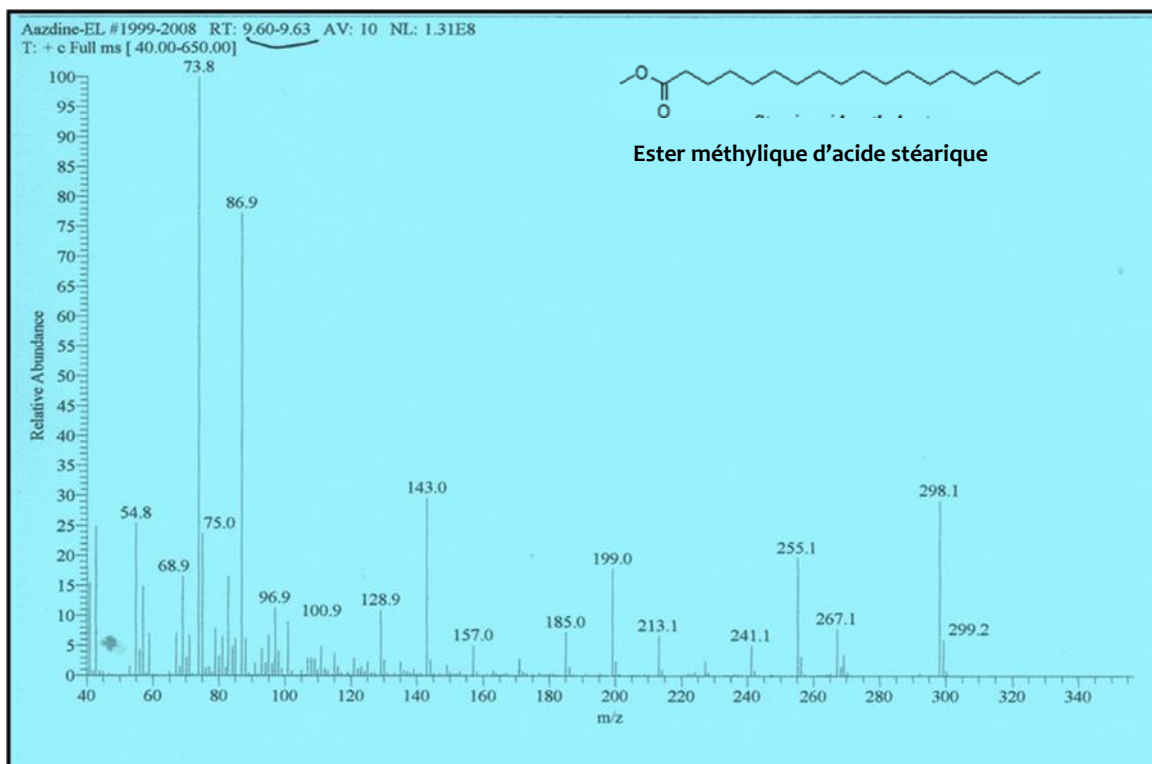


Figure 3.35 Spectre MS de l'ester méthylique d'acide stéarique isolé de l'huile de *Linum usitatissimum* L. (pic à 9.62 minutes).

■ FAMES isolées à partir de l'huile de *Nigella sativa* L.

La lecture des spectres de masse de la fraction méthylique d'esters d'acides gras isolée à partir de l'huile de *Nigella Sativa* L., renseigne les mêmes informations rapportées par les spectres de masse des fractions précédentes. En effet l'on peut prélever les mêmes fragments ioniques presque aux mêmes réarrangements Mc Lafferty. Les élucidations des spectres révèle là encore la richesse de cette fraction en esters méthyliques d'acide palmitique, α -linoléique, linoléique et stéarique. Toutefois, une différence peut être émise en ce qui concerne l'apparition d'un nouveau spectre à 10.32 minutes témoignant par la présence d'une nouvelle fraction qui, après comparaison à la banque de données est probablement l'acide. Figures 3.36-3.37-3.38-3.39.

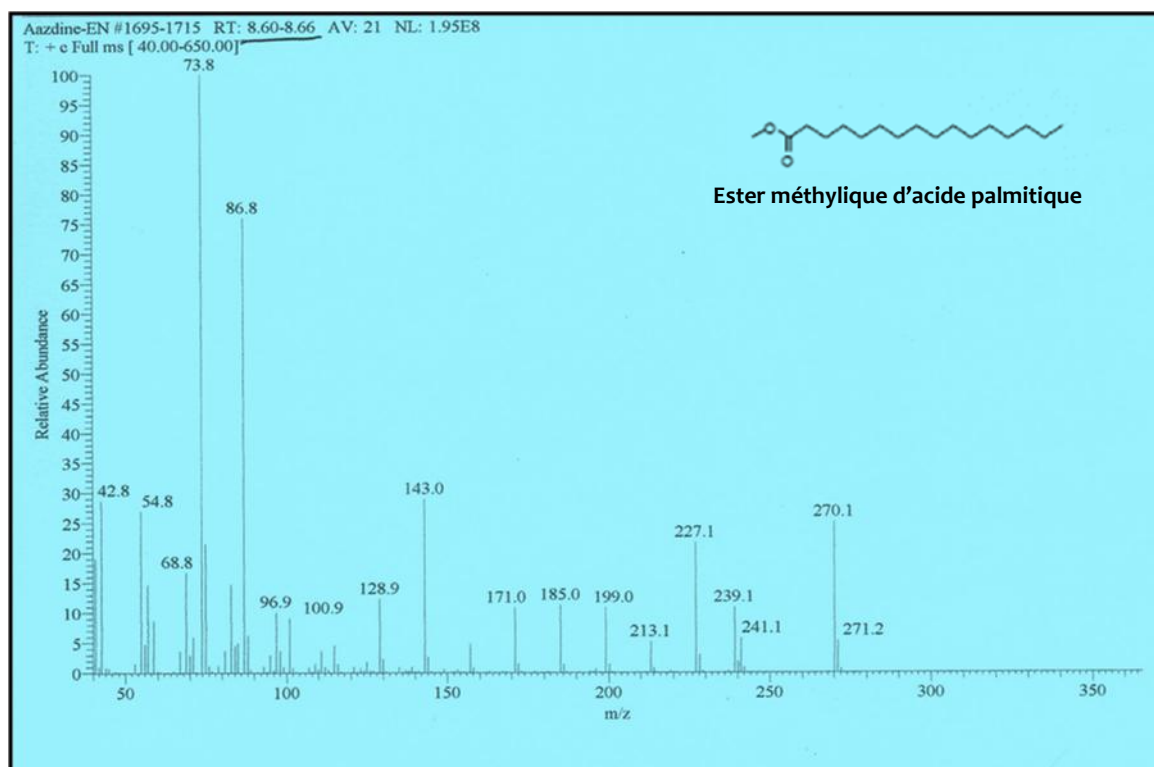


Figure 3.36 Spectre MS de l'ester méthylique d'acide palmitique isolé de l'huile isolé de l'huile de *Nigelle sativa* L. (pic à 8.63 minutes).

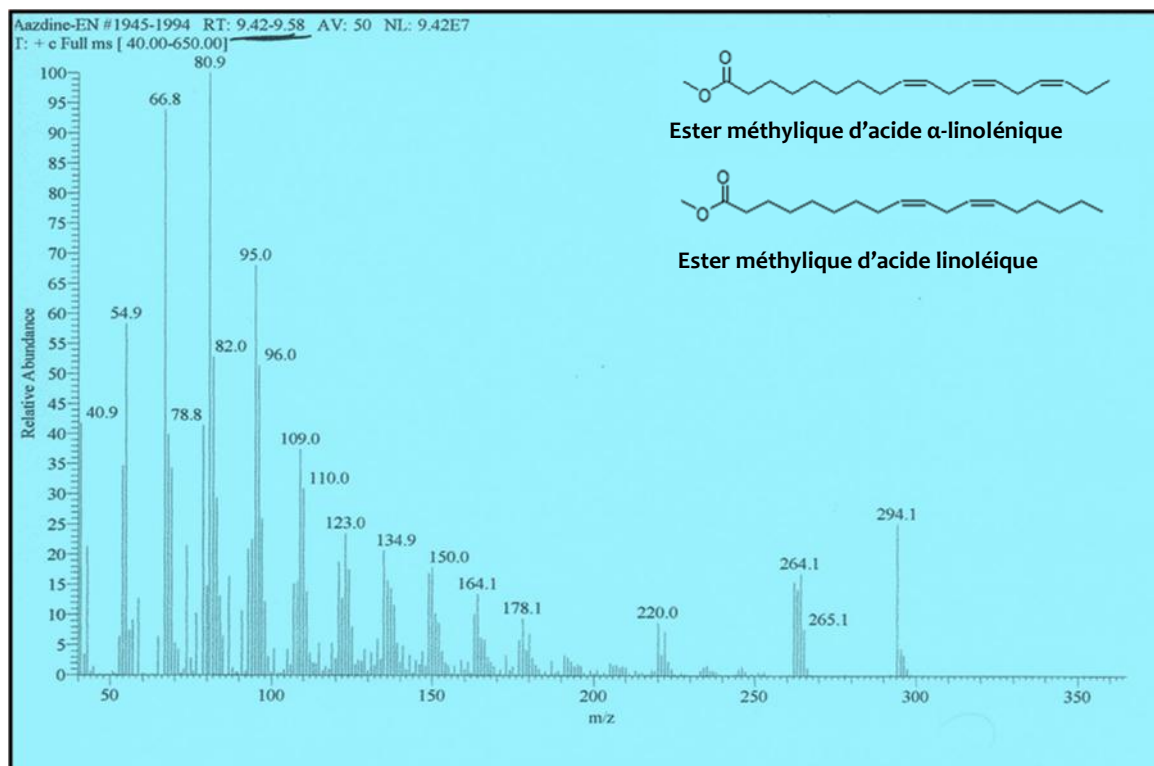


Figure 3.37 Spectre MS des esters méthyliques d'acides α -linoléique et linoléique isolés de l'huile de *Nigelle sativa* L. (pics à 9.45-9.56 minutes)

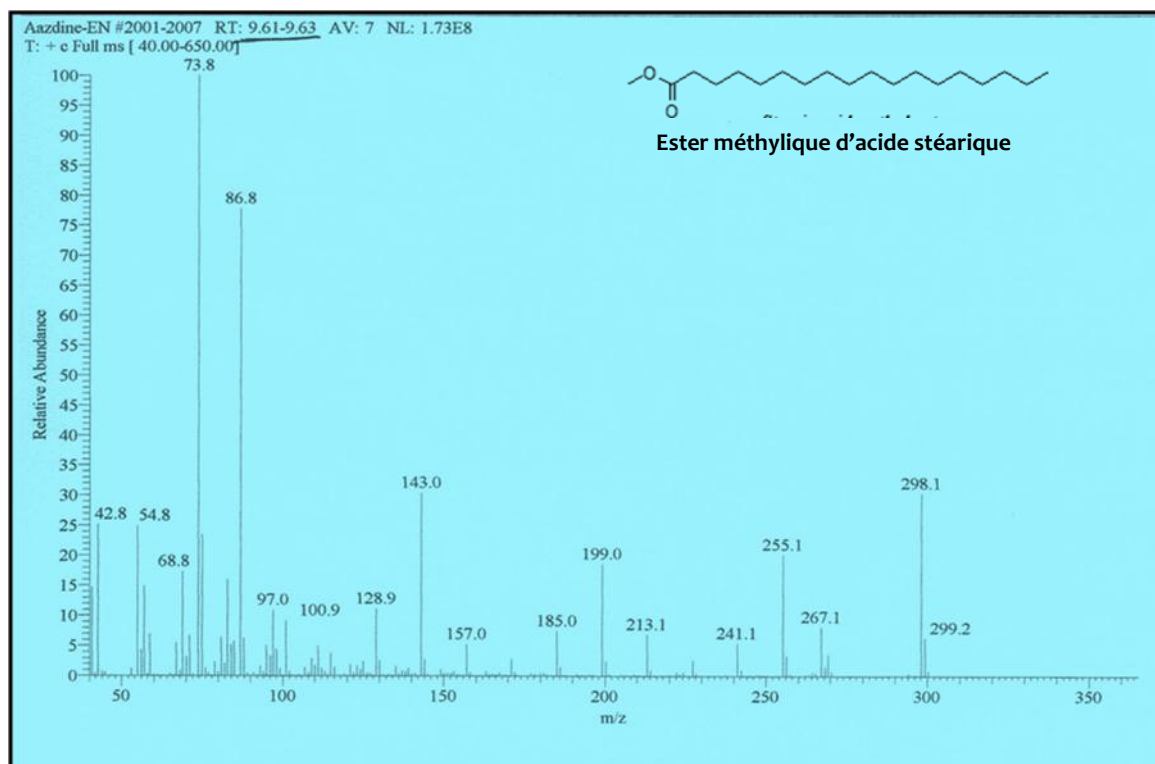


Figure 3.38 Spectre MS de l'ester méthylique d'acide stéarique isolé de l'huile de *Nigella sativa* L. (pic à 9.62 minutes).

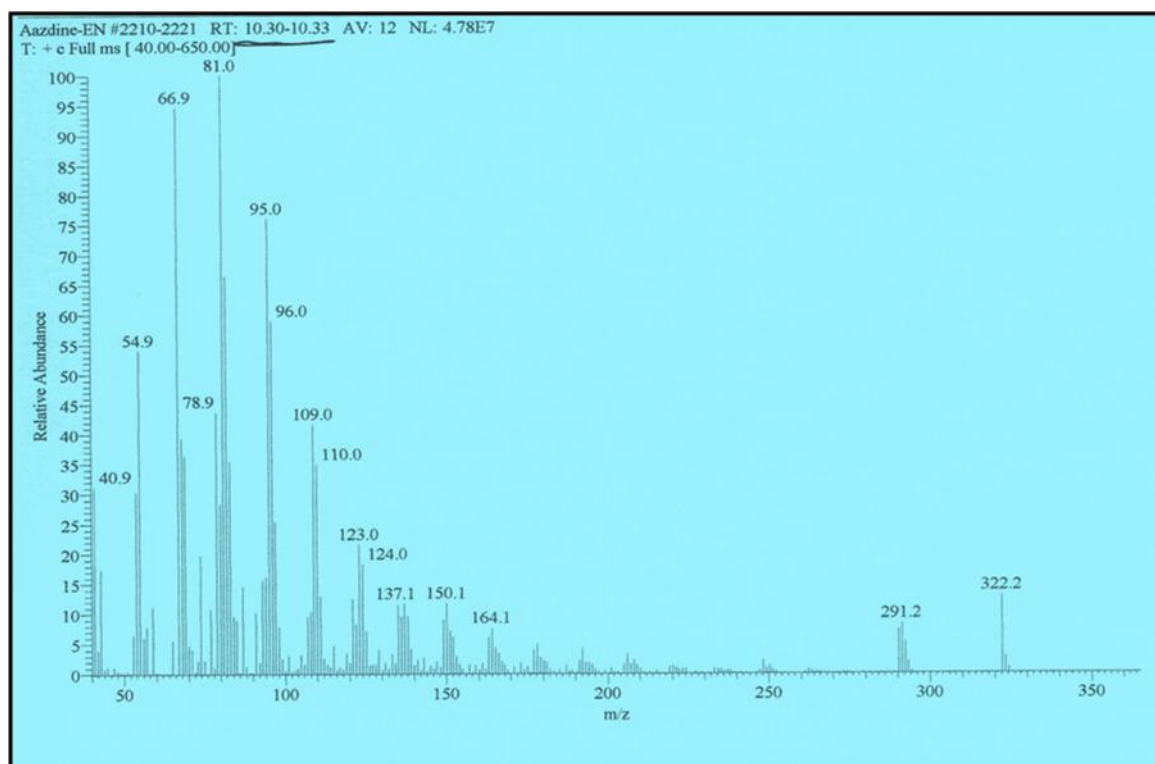


Figure 3.39 Spectre MS de l'ester méthylique d'acide isolé de l'huile de *Nigella sativa* L. (pic à 10.30 minutes).

b. Analyse par Infrarouge (IR)

■ FAMES de *Citrullus colocynthis* L.

Les régions spectrales obtenues (figure 3.40) peuvent être divisées de la manière suivante :

- **3009,71 cm^{-1}** : cette région contient les vibrations fondamentales d'élongation des groupements $=\text{C}-\text{H}_{\text{cis}}$. L'intensité de l'absorption dans cette région est proportionnelle au nombre de doubles liaisons. Dans notre cas, et d'après le pic moyen de ce groupement on peut conclure que notre produit contient plus de doubles liaisons.
- **2854,29 ; 2923,93 cm^{-1}** : cette partie du spectre est caractéristique des vibrations d'élongation du groupe C-H aliphatique. Une bande est observable, une intense à 2923,93 cm^{-1} est associée à l'élongation asymétrique du groupement CH_2 et CH_3 . L'autre bande moins intense à 2854,29 cm^{-1} est attribuée à l'élongation symétrique du groupe CH_2 .
- **1743,37 cm^{-1}** : cette élongation est attribuée au groupe C=O des esters.
- **1658,37 cm^{-1}** : ce pic est attribué à la vibration du groupe C=C. Donc cette bande confirme bien avec la bande de **3009,71 cm^{-1}** que notre produit contient de doubles liaisons C=C.
- **1435,94 ; 1458,28 et 1397,96 cm^{-1}** : ces bandes sont attribuables respectivement aux vibrations de déformation des groupes CH_2 et CH_3 .
- **1169,97 cm^{-1}** : cette bande est caractéristique aux vibrations d'élongation du groupe C-O ester. La bande du groupe C-O est en effet déplacée vers les basses fréquences sous l'influence de l'effet donneur inductif du groupement O-R.

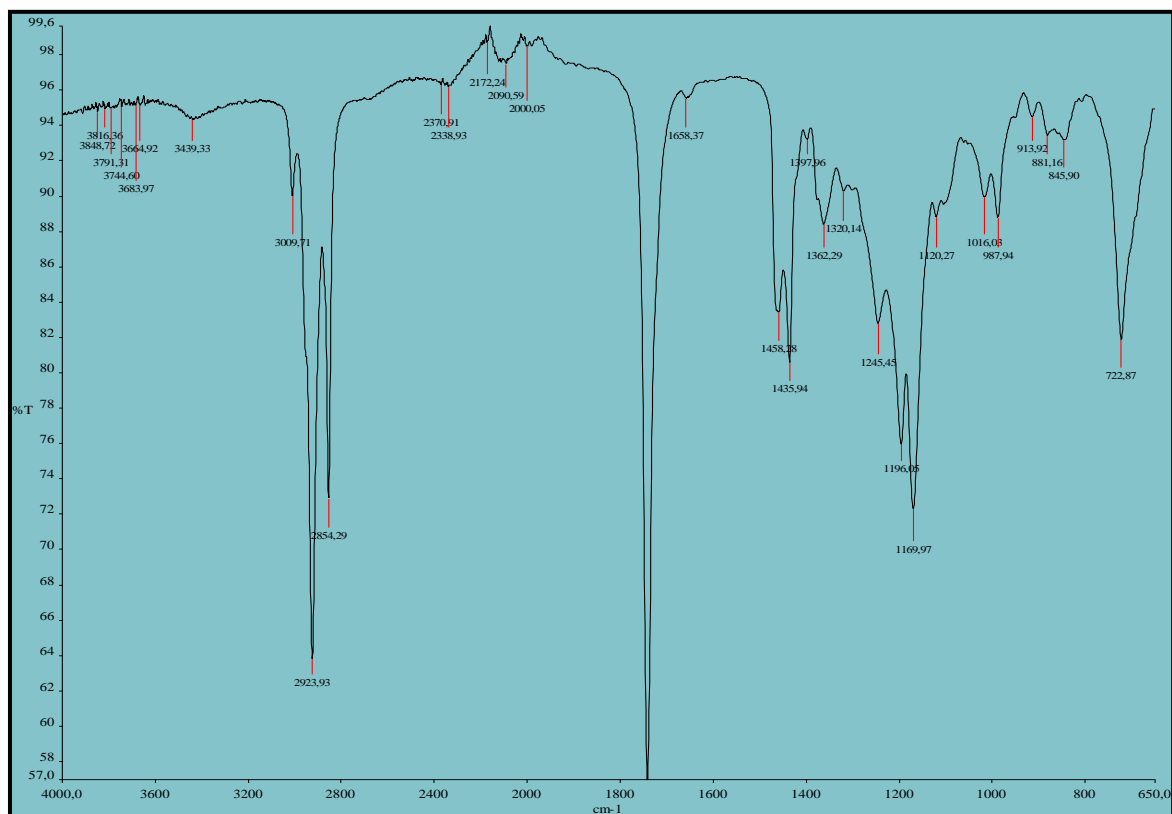


Figure 3.40 Spectre infrarouge de l'ester isolé de l'huile *Citrullus colocynthis* L.

■ FAMES de *Linum usitatissimum* L.

Les régions spectrales obtenues (figure 3.41) peuvent être divisés de la manière suivante:

- **3011,34 cm⁻¹**: cette région contient les vibrations fondamentales d'élongation des groupements =C–H_{cis}. L'intensité de l'absorption dans cette région est proportionnelle au nombre de doubles liaisons. Dans notre cas, et d'après pic moyen de ce groupement on conclut que notre produit contient plus de doubles liaisons.
- **2854,47 ; 2925,11 cm⁻¹**: cette partie du spectre est caractéristique des vibrations d'élongation du groupe C–H aliphatique. Une bande est observable, une intense à 2925,11 cm⁻¹ est associée à l'élongation asymétrique du groupement CH₂ et CH₃. L'autre bande moins intense à 2854,47 cm⁻¹ est attribuée à l'élongation symétrique du groupe CH₂.
- **1743,37 cm⁻¹**: cette élongation est attribuée au groupe C=O des esters.
- **1652,84 cm⁻¹**: ce pic est attribué à la vibration du groupe C=C. Donc cette bande confirme bien avec la bande de **3009,71 cm⁻¹** que notre produit contient de doubles liaisons C=C.
- **1435,82 ; 1457,49 et 1397,36 cm⁻¹**: ces bandes sont attribuables respectivement aux vibrations de déformation des groupes CH₂ et CH₃.

- **1169,98 cm⁻¹** : cette bande est caractéristique aux vibrations d'élongation du groupe C–O ester. La bande du groupe C–O est en effet déplacée vers les basses fréquences sous l'influence de l'effet donneur inductif du groupement O–R.

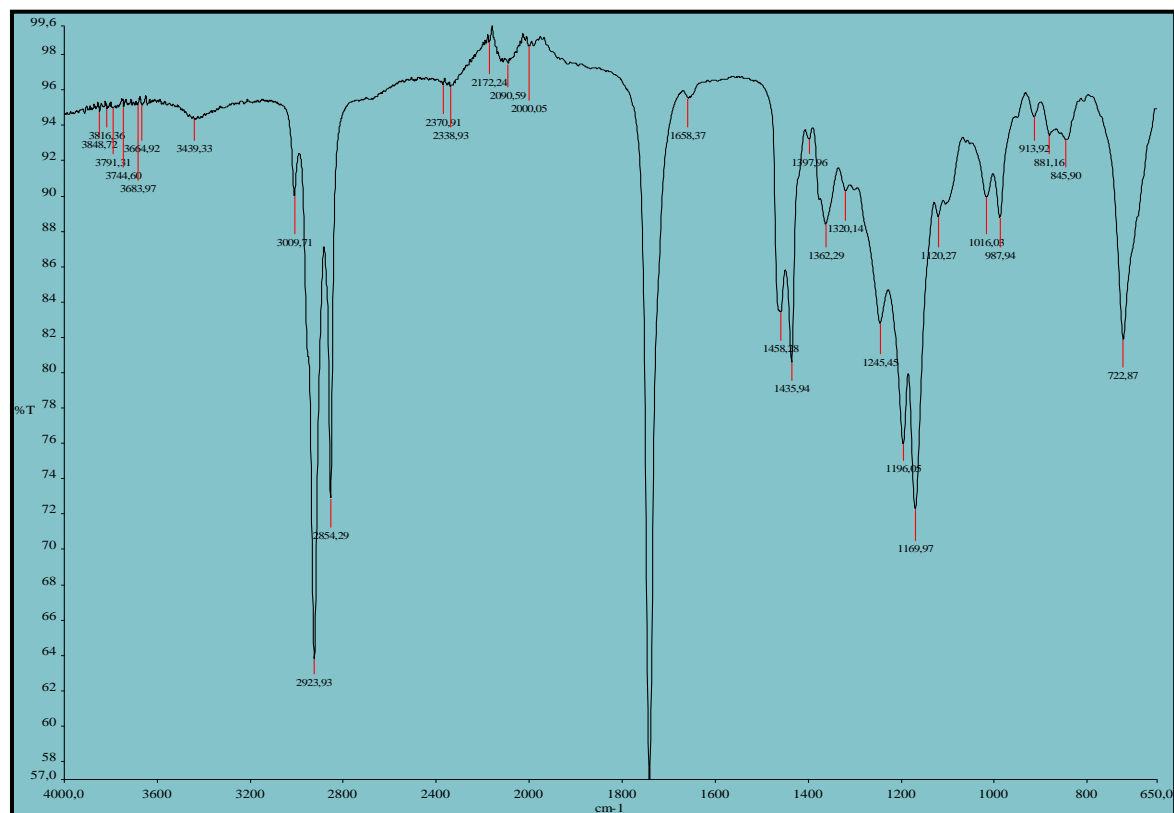


Figure 3.41 Spectre infrarouge de l'ester isolé de l'huile *Linum ussitatissimum* L.

■ FAMES de *Nigella sativa* L.

Les régions spectrales obtenues (figure 3.42) peuvent être divisées de la manière suivante :

- **3009,77 cm⁻¹** : cette région contient les vibrations fondamentales d'élongation des groupements =C–H_{cis}. L'intensité de l'absorption dans cette région est proportionnelle au nombre de doubles liaisons. Dans notre cas, et d'après pic moyen de ce groupement on conclut que notre produit contient plus de doubles liaisons.
- **2854,22 ; 2923,98 cm⁻¹** : cette partie du spectre est caractéristique des vibrations d'élongation du groupe C–H aliphatique. Une bande est observable, une intense à 2923,98 cm⁻¹ est associée à l'élongation asymétrique du groupement CH₂ et CH₃. L'autre bande moins intense à 2854,22 cm⁻¹ est attribuée à l'élongation symétrique du groupe CH₂.
- **1743,37 cm⁻¹** : cette élongation est attribuée au groupe C=O des esters.

- **1652,71 cm⁻¹** : ce pic est attribué à la vibration du groupe C=C. Donc cette bande confirme bien avec la bande de **3009,77 cm⁻¹** que notre produit contient de doubles liaisons C=C.
- **1435,82 ; 1458,28 et 1361,93 cm⁻¹** : ces bandes sont attribuables respectivement aux vibrations de déformation des groupes CH₂ et CH₃.

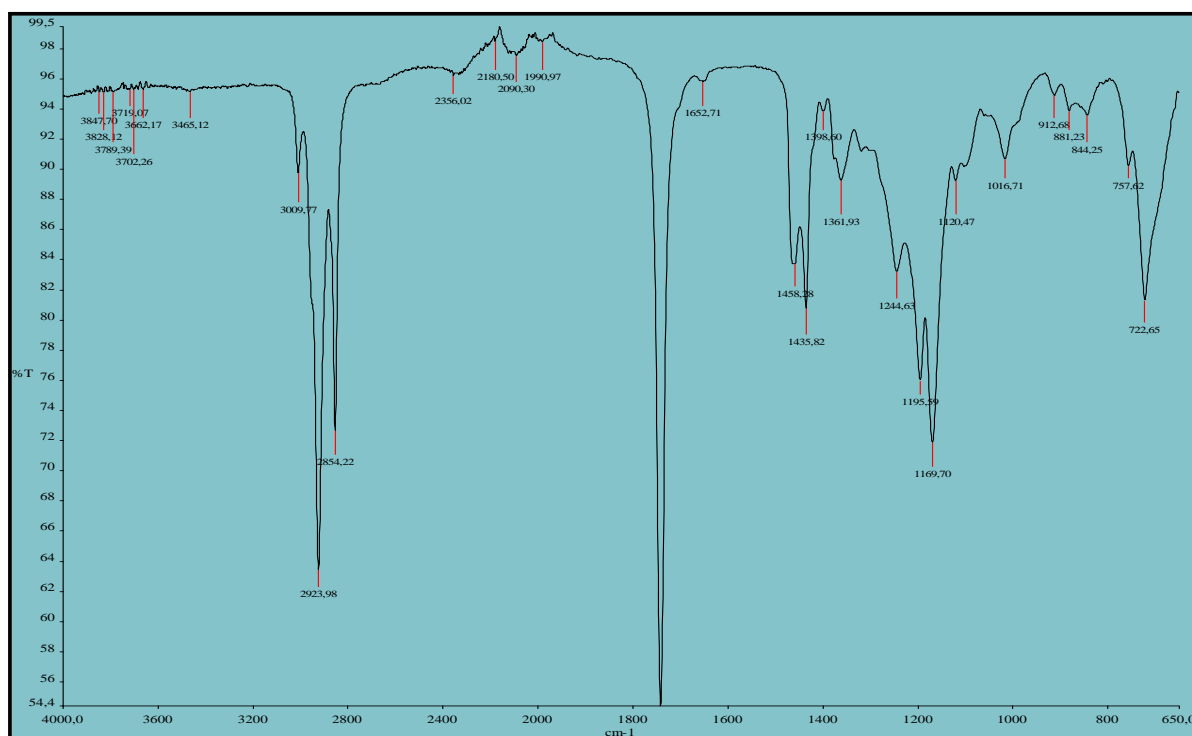


Figure 3.42 Spectre infrarouge de l'ester isolé de l'huile *Nigella sativa* L.

c. Analyse par RMN.¹H

La RMN devient en chimie un outil d'importance croissante. Elle connaît une multiplication de méthodes nouvelles, telles que l'utilisation généralisée de gradients de champ ou la spectroscopie à trois, puis quatre dimensions. Ces développements sont souvent réalisés dans des laboratoires spécialisés, surtout intéressés par l'élaboration de méthodes, pour lesquels les systèmes chimiques ne sont souvent que des « plans d'épreuve » de validation de ces méthodes. Elle est basée sur la propriété magnétique de certains atomes (ou noyaux) dont le proton (¹H), le carbone (¹³C). Nous avons fait recours à cette méthode pour déterminer le nombre de protons et leur distribution dans la chaîne carbonée.

■ FAMES de *Citrullus colocynthis* L.

Le Spectre RMN.¹H 200 MHz de la figure 3.43 montre un signal massif à 0,819 (3H) assigné au CH₃-R. Un autre signal sous forme massif entre 5,25 -5,28 ppm est attribué aux protons éthyliques CH=CH. Les protons de type -C-CH₂-C apparaissent sous forme massif aux environs de 1,3 ppm. Les protons situés vers 1,55 ppm correspondent aux protons de type -CH₂- en β de CO₂Me. En outre, le signal situé à 2ppm est attribué aux protons de type -C-CH₂-C=C-. De même les protons de type -C-CH₂-COOR se situent sur le spectre vers 2,3 ppm. Le signal situé à 3,6 ppm correspond aux protons méthyliques de l'ester (COOCH₃).

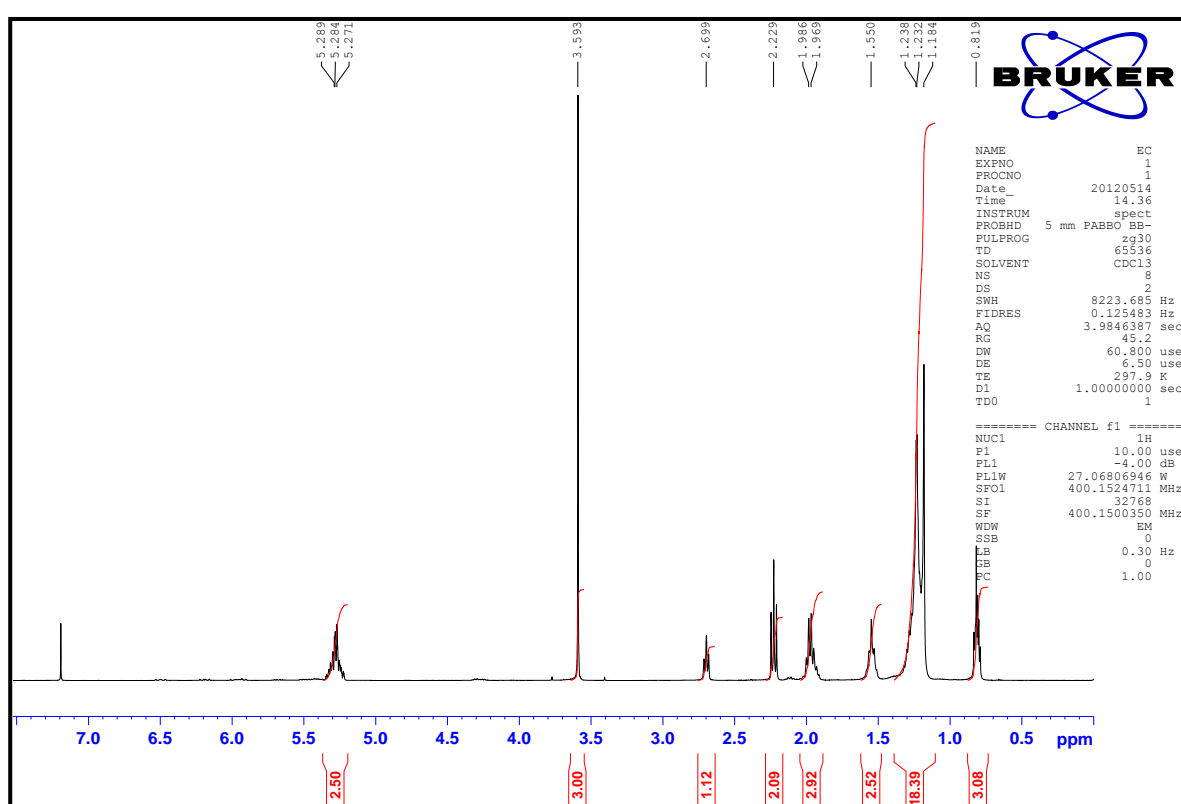


Figure 3.43 Spectre RMN.¹H de l'ester de *Citrullus colocynthis* L.

■ FAMES de *Linum usitatissimum* L.

Le Spectre RMN.¹H 200 MHz de la figure 3.44 montre un signal massif à 0,810 -0,924 (3H) assigné au CH₃-R. Un autre signal sous forme massif entre 5,27 -5,30 ppm est attribué aux protons éthyliques CH=CH. Les protons de type -C-CH₂-C apparaissent sous forme massif aux environs de 1,18 -1,23 ppm. Les protons situés vers 1,53 -1,54 ppm correspondent aux protons de type -CH₂- en β de CO₂Me. En outre, le signal situé à 1,91 -2 ppm est attribué aux protons de type

-C-CH₂-C=C-. De même les protons de type -C-CH₂-COOR se situent sur le spectre vers 2,21 - 2,24 ppm. Le signal situé à 3,59 ppm correspond aux protons méthyliques de l'ester (COOCH₃).

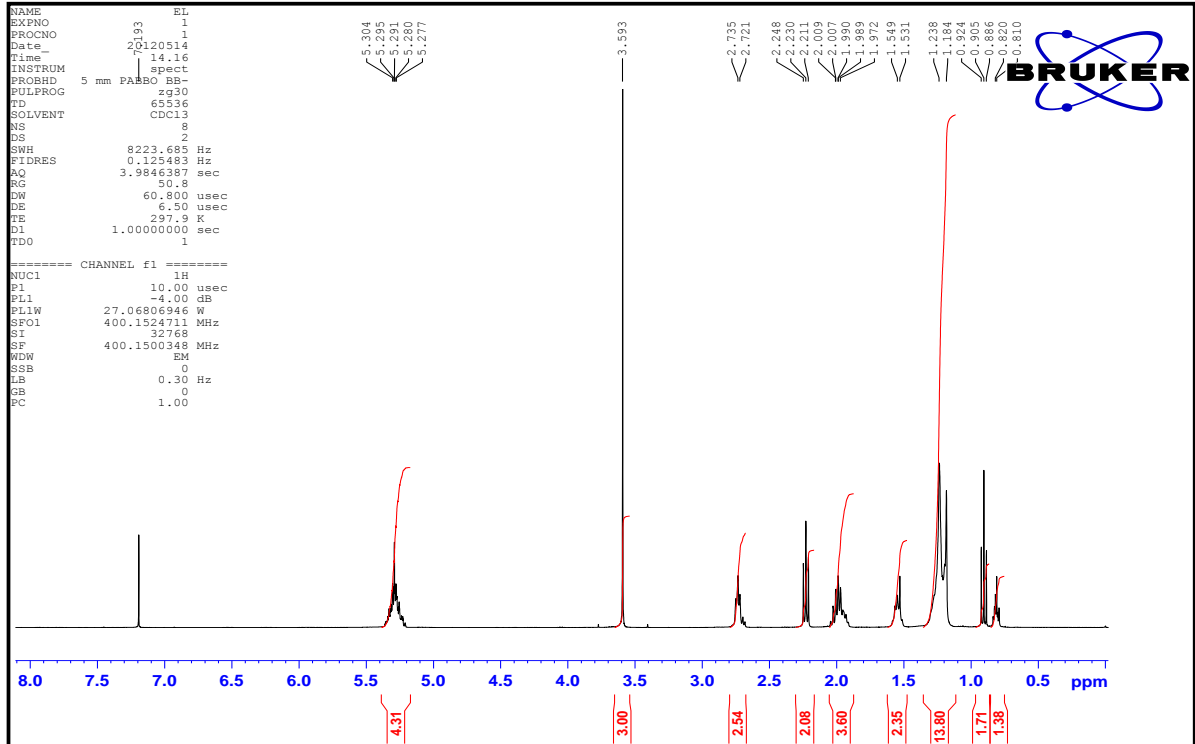


Figure 3.44 Spectre RMN.¹H de l'ester de *Linum usitatissimum*

■ FAMES de *Nigella sativa* L.

Le Spectre RMN.¹H 200 MHz de la figure 3.45 montre un signal massif à 0,81 -0,82 (3H) assigné au CH₃-R. Un autre signal sous forme massif entre 5,26 -5,29 ppm est attribué aux protons éthyléniques CH=CH. Les protons de type -C-CH₂-C apparaissent sous forme massif aux environs de 1,18 -1,23 ppm. Les protons situés vers 1,48 -156 ppm aux protons de type -CH₂- en β de CO₂Me. En outre, le signal situé à 1,97 -1,98 ppm est attribué aux protons de type -C-CH₂-C=C-. De même les protons de type -C-CH₂-COOR se situent sur le spectre vers 2,21 -2,25 ppm. Le signal situé à 3,56 ppm correspond aux protons méthyliques de l'ester (COOCH₃).

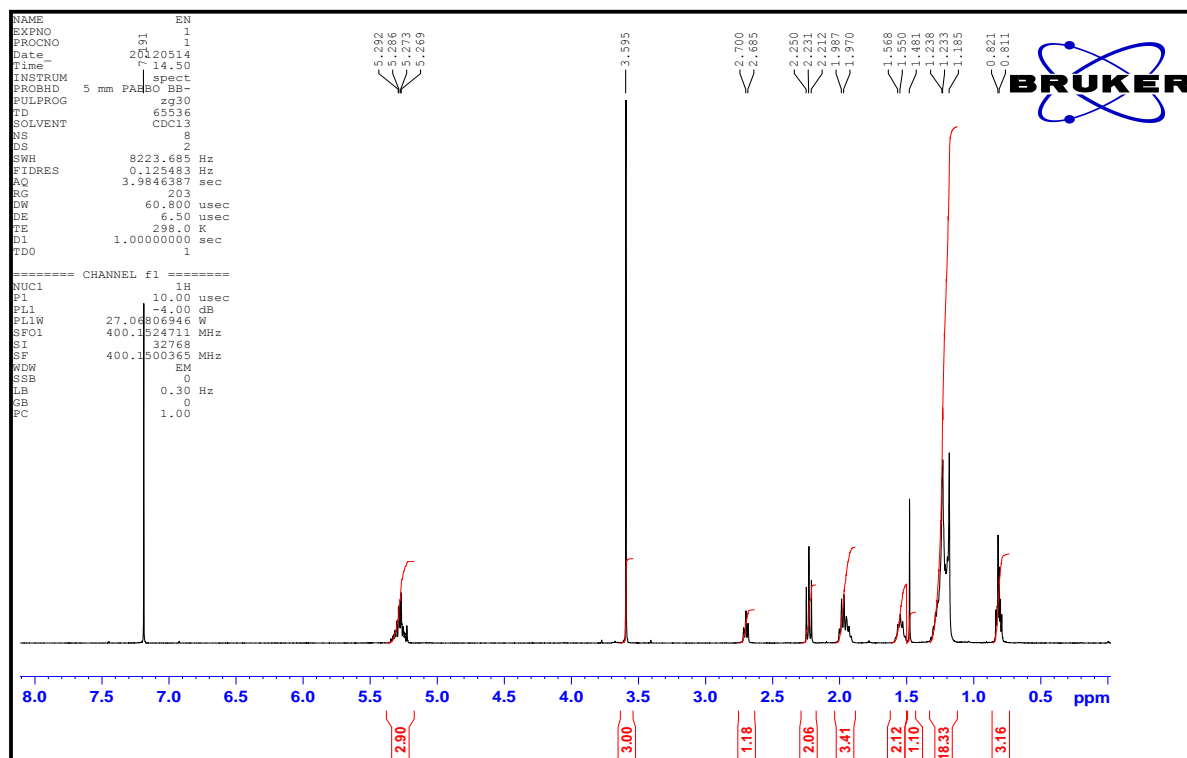


Figure 3.45 Spectre RMN.¹H de l'ester de *Nigella sativa*

d. Analyse par RMN.¹³C

La RMN du carbone 13 (¹³C ou parfois simplement appelée RMN du carbone) est l'application de la résonance magnétique nucléaire (RMN) du carbone. Elle permet l'identification des atomes de carbone dans une molécule organique. Ainsi, la RMN du ¹³C est un outil important dans la détermination de la structure chimique en chimie organique. Seul l'isotope ¹³C du carbone de spin 1/2, dont l'abondance naturelle n'est que de 1,1 %, n'est détectable par RMN, parce que l'isotope du carbone principal, ¹²C, a un spin nul.

■ FAMES de *Citrullus colocynthis*

D'après le spectre figure 3.46, il y a un singulet situé à 14,04-14,09 ppm correspond au carbone type **CH₃** ; COOCH₃ et COOCH₃. En plus, un massif est observé pour les carbones type **CH₂** (22,56 ; 22,60 ; 24,94 ; 25,62 ; 27,10 ; 27,19 ; 29,09 ; 29,11 ; 29,14 ; 29,25 ; 29,34 ; 29,44 ; 29,51 ; 29,58 ; 29,67 ; 31,52 ; 31,92 ; 34,09 ppm). Les carbones éthyléniques de type — **CH=CH** — apparaissent sur le spectre dans la zone suivante (127,90 ; 128,04 ; 129,74 ; 130,03 et 130,20 ppm). En plus, le carbone quaternaire ROCOCH₃ se situe sur le spectre vers 174,28 ppm.

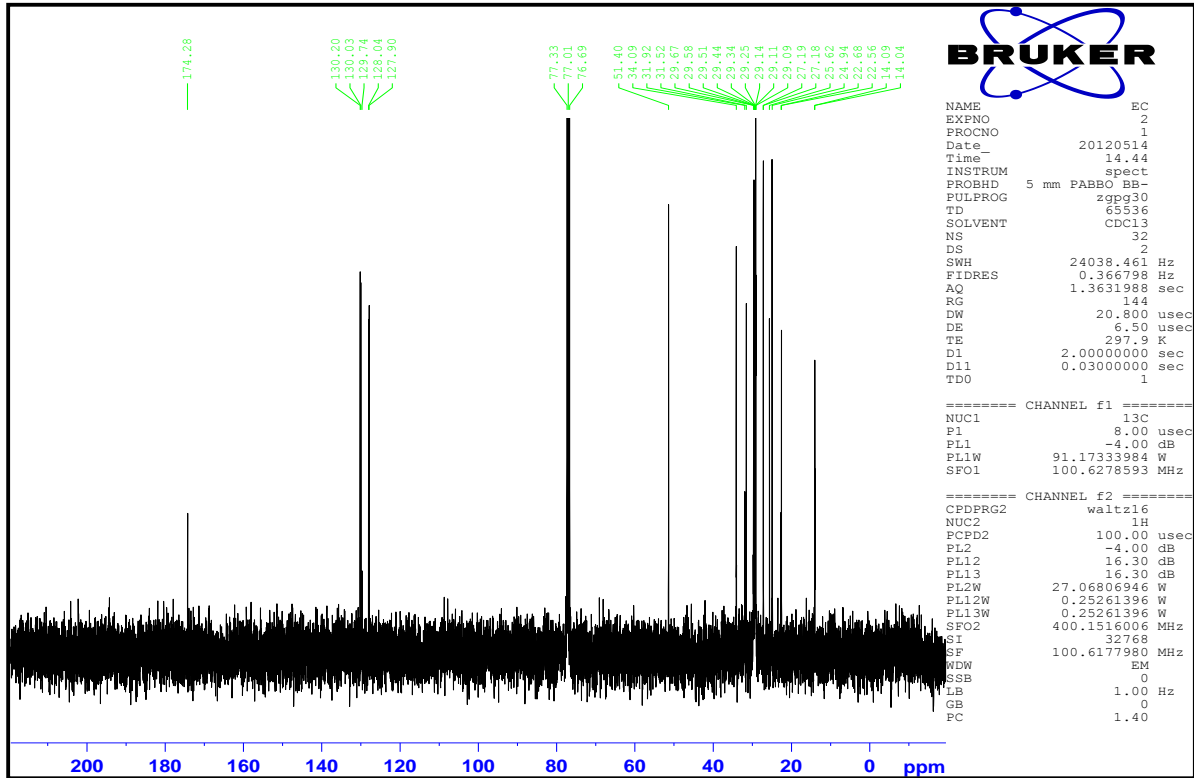


Figure 3.46 Spectre RMN.¹³C de l'ester de *Citrullus colocynthis*

■ FAMES de *Linum usitatissimum*

L'analyse du spectre de la figure 3.47, montre un singulet situé à 14,09 -14,25 ppm correspond au carbone type CH_3 ; COOCH_3 et COOCH_3 . En plus, un massif est observé pour les carbones type CH_2 (20,54 ; 22,67 ; 24,94 ; 25,52 ; 25,61 ; 27,19 ; 29,08 ; 29,11 ; 29,14 ; 29,25 ; 29,31 ; 29,56 ; 29,68 ; 29,76 ; 31,52 ; 31,90 ; 34,09 ppm). Les carbones éthyléniques de type —CH=CH— apparaissent sur le spectre avec les déplacements chimiques suivants (127,11 ; 127,13 ; 128,25 ; 128,27 ; 129,74 ; 129,99 ; 130,03 ; 130,26 et 131,95 ppm). En outre, le carbone quaternaire ROCOCH_3 se situe sur le spectre vers 174,27 ppm.

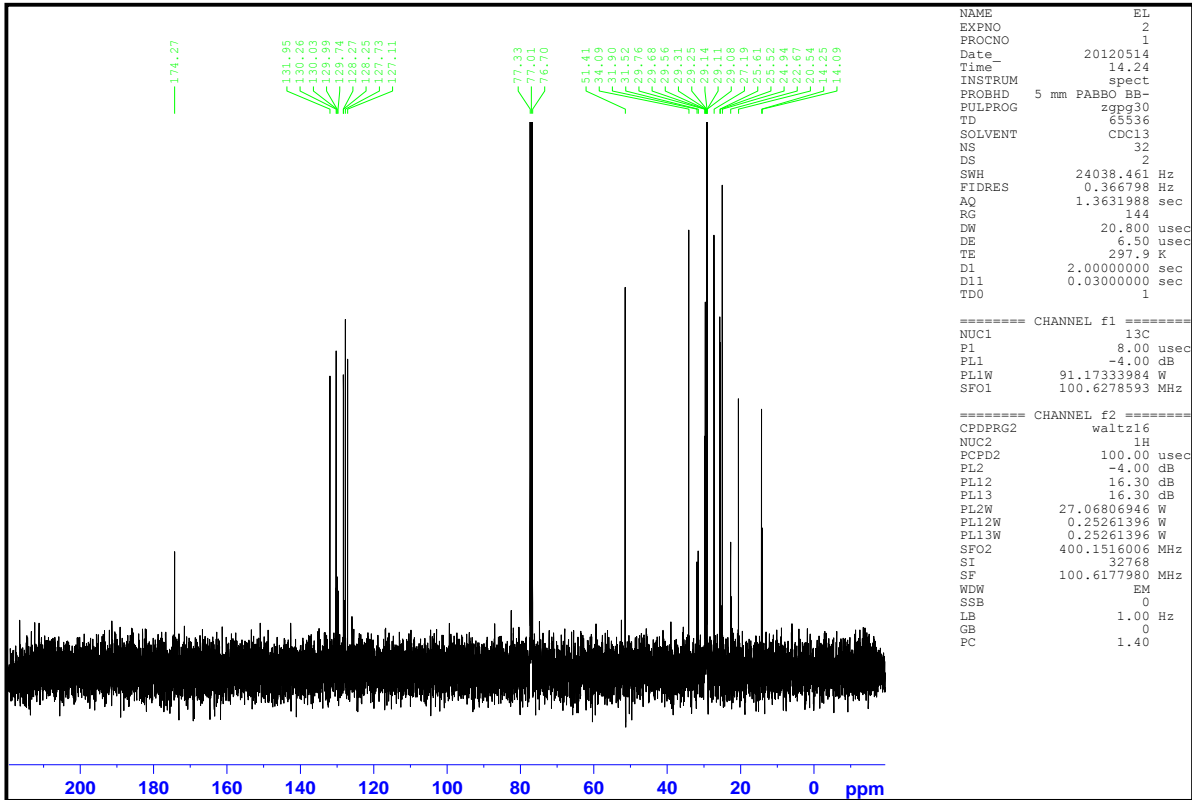


Figure 3.47 Spectre RMN.¹³C de l'ester de *Linum usitatissimum*

■ FAMES de *Nigella sativa*

L'analyse du spectre sur la figure 3.48, montre un singulet situé à 14,05 -14,09 ppm correspond au carbone type CH_3 ; COOCH_3 et COOCH_3 . En plus, un massif est observé pour les carbones type CH_2 (22,56 ; 22,67 ; 24,94 ; 25,62 ; 27,20 ; 29,09 ; 29,11 ; 29,15 ; 29,25 ; 29,31 ; 29,34 ; 29,44 ; 29,51 ; 29,58 ; 29,68 ; 29,76 ; 31,52 ; 31,90 ; 34,09 ppm). Les carbones éthyléniques de type $\text{CH}=\text{CH}$ apparaissent sur le spectre avec les déplacements chimiques suivants (127,91 ; 128,04 ; 129,74 ; 129,99 ; 130,03 et 130,20 ppm). En outre, le carbone quaternaire ROCOCH_3 se situe sur le spectre vers 174,27 ppm.

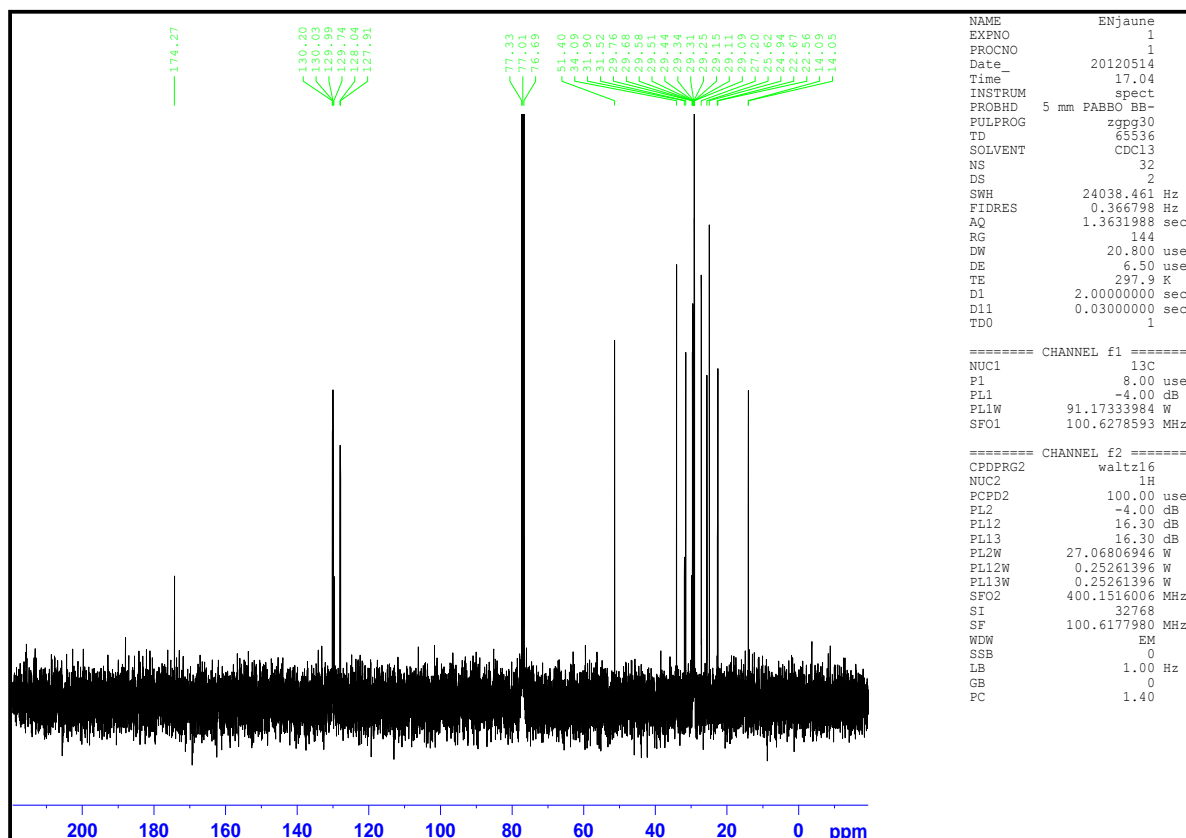


Figure 3.48 Spectre RMN.¹³C de l'ester de *Nigella sativa*

3.3 Discussion

Les plantes sont constituées, dans leur extrême richesse et diversité, de molécules aux structures complexes, dont les fonctionnalités répondent, lorsqu'elles sont valorisées, aux différents besoins des êtres vivants du règne animal. Les ressources végétales présentent l'avantage d'être renouvelables et d'être très largement présentes dans leur diversité sur l'ensemble des terres (**BLANC & GOMA, 2006**).

Par ses contrastes géographiques, la région aride du sud-ouest Algérien offre dans les conditions favorables un bioclimat permettant l'installation d'une flore à endémisme marqué, formée par diverses espèces de différentes souches poussant à l'état sauvage, ce qui fait de la région un véritable réservoir de matières premières et une remarquable usine naturelle. En effet, la flore saharienne, caractérisée par sa bio-résistance au climat aride, est riche en espèces pratiquement inexplorées (**BENZAHI, 2001**) ou insuffisamment exploitées susceptibles d'avoir des propriétés biologiques diverses par la large variété des métabolites actives qu'elles

produisent. Ces substances en plus de leur intérêt dans l'organisme de ces plantes, elles rendent ces dernières, la source des composants chimiques complexes à très forte valeur, utilisés dans les industries pharmaceutiques, agroalimentaires et cosmétiques (**SALEH RAMDANE, 2007**).

Ces dernières décennies, plusieurs études se sont penchées sur la valorisation des plantes du Sahara algérien, notamment les plantes médicinales qui sont utilisées traditionnellement par la population de la région saharienne depuis longtemps tant pour conserver et aromatiser ses aliments que pour traiter ses maladies. Cette catégorie de plantes demeure très distincte des autres, mérite d'être valorisée et présentée sous les feux de l'actualité, pour une meilleure exploitation.

Pour une meilleure et plus précise application, il est plus qu'impératif d'étudier la composition biochimique des métabolites issus de ces plantes en vue de déceler leurs molécules à activités biologiques qui est le plus souvent corrélée aux caractéristiques physico-chimiques pouvant avoir des conséquences négatives ou positives sur la qualité de leurs activités biologiques (**ZIANE, 2007**).

Sur le plan de la caractérisation physico-chimique, les huiles faisant l'objet de cette étude, ont présenté une rentabilité variable allant de [18 % à 40 %] d'huile extraite pendant six heures d'extraction au soxhlet avec [18 %, 33.71 % et 39.96 %] respectivement pour l'huile de *C.colocynthis*, l'huile de *N.sativa* et l'huile de *L.usitatissimum*. Ces valeurs sont proches voir similaires à celles rapportées par de nombreuses études ainsi qu'aux normes du codex alimentarius.

Les rendements obtenus en huile de *C.colocynthis* sont similaires à ceux obtenus par les travaux D'**ABU NASER & POTTS (1953)** ayant trouvé un rendement de 18 % à partir des graines de fruits collectées du Sahara d'Algérie. Ces résultats corroborent aussi les rendements trouvés par (**SEBBAGH et al., 2009**) ; (**BOUBLENZA et al., 2011**) et (**AMMAMOU et al., 2011**), ayant collecté des fruits de *Citrullus colocynthis* de la région de Mechria (Ouest de l'Algérie). Ces rendements sont en accords aussi avec les résultats trouvés par **SCHAFFERMAN et al., (1998)**, **YANIV et al.,(1999)** sur des graines d'origine palestinienne affichant des rendements de [17 à 19 %]. **Khan & Gul (1975)** ont aussi extrait un rendement qui s'est échelonné entre [13-19 %] des graines collectées au Pakistan. D'autres travaux réalisés par **ZIYADA & EI HOSSEIN (2008)** ont trouvé des rendements

supérieurs [35 %]. Notons qu'un rendement très faible [7%] a été obtenu par **JAYARAMAN et al (2009)**.

En ce qui concerne l'huile de *N.sativa*, les résultats des rendements des extractions [33.71 %] sont en accord avec ceux cités par (**MERAL et al., 2004**); (**MEHM & KANTER, 2005**); (**AKRAM, 1999**) et (**ZAOUI et al., 2002**) qui ont montré que le rendement d'extraction était supérieur à 30 %. En outre (**AL-BEITAWI et al, 2009**); (**NEVIN, 2005**); (**ARICI, 2005**); (**ALI & GERALD, 2003**) et (**GHEDIRA, 2006**) ont constaté que le rendement se situe dans l'intervalle de grandeur [36 à 38 %]. De plus, nos résultats sont proches de ceux obtenus avec cette même huile mais d'origine Égyptienne par (**ATTA, 2003**) où le rendement obtenu était de l'ordre de [34.80 %], à l'encontre des résultats obtenus par **CHEIKH-ROUHOU et al (2007)** sur une variété d'origine iranienne dont le rendement était de 40.35 %.

Ces résultats sont aussi semblables à ceux obtenus par **KÖKDIL et al (2005)** ayant travaillé sur dix espèces de graines de *N. sativa* d'origine turque, ce groupe a effectivement constaté une variabilité dans le rendement en huiles [17.6 à 41.3 %] selon la variabilité des espèces étudiées. En fin, il faut dire que, cette différence peut être aussi due aux périodes de prélèvement, aux conditions environnementales et géographiques et à la variété de la plante. Enfin, il faut noter que **HANAFY & HATEM en (1991)** ont trouvé un rendement de 11 %.

Pour l'huile extraite des graines de *L. usitatissimum*, le rendement d'extraction était de l'ordre de [39.96 %], ce résultat s'inscrit dans l'intervalle publié par le centre de recherche du Québec [35 à 45 %] et ceux des travaux de **DIEDRICHSEN (2001)** qui ont trouvé des rendements échelonnés entre [26 à 45 %].

Les huiles végétales sont essentiellement constituées d'acides gras représentés par les triglycérides. À ces acides gras s'ajoutent d'autres constituants non glycéridiques encore appelés constituants mineurs (**NDEYE, 2001**). Par ailleurs, la qualité d'une huile dépend essentiellement de sa composition chimique. Néanmoins, suivant les conditions d'extraction et de conservation, les divers éléments constitutifs de l'huile peuvent subir des modifications plus ou moins importantes pouvant porter préjudice à leur qualité (**NDEYE, 2001**). La détermination des caractères physiques des huiles (la densité relative, et l'indice de réfraction) dépend de la composition du corps gras et de la température.

L'analyse des résultats de la densité relative et de l'indice de réfraction montre que les valeurs obtenues sont variables, mais restent dans l'intervalle des normes requises par le *Codex Alimentarius* qui fixent des valeurs de [0.919 – 0.925] pour la densité relative et [1.4677 – 1.4771] pour l'indice de réfraction.

Les valeurs de la densité relative obtenues pour l'huile de *C.colocynthis* [0.9087] sont en accord avec ceux trouvés par (SEBBAGH *et al.*, 2009) et ceux de (BOUBLENZIA *et al.*, 2011) et d'AKPAMBANG & *al* (2008). L'huile de *N. sativa* analysée par TAUSEEF (2009) a présenté la même grandeur de densité relative [0.923 ±0.001]. Pour ce qui est de la densité relative de l'huile de *L. usitatissimum* [0.9320±0.001], les résultats s'inscrivent dans l'intervalle publiés par le centre de recherche du Québec et sont en adéquation avec ceux des travaux de DIEDRICHSEN (2001).

L'analyse des résultats de l'indice de réfraction montre que celui-ci a été de l'ordre [1.4595, 1.4740 et 1.4720] respectivement pour l'huile de *L. usitatissimum*, huile de *C. colocynthis* et l'huile de *N. sativa*, ces valeurs sont proches de ceux fixées par le *Codex Alimentarius* et ceux décrits par la bibliographie. Ces résultats sont en accord avec ceux trouvés par AKPAMBANG & *al* (2008) ayant mesuré un indice de réfraction de 1.47 ±0.02 pour l'huile de *C.colocynthis*, ainsi que les travaux de HASSIMI *et al* (2007) ayant décrit un indice de réfraction dans l'intervalle de grandeur [1.4607 –1.4620]. Pour l'huile de *N. sativa*, TAUSEEF (2009) indique que l'huile issue des graines récoltées de Tunisie, ont présentées un indice de réfraction de 1.473 ±0.001.

L'indice de réfraction et la densité relative dépendent de la composition du corps gras et de la température, et leur augmentation est due à l'apparition d'autres composés à poids moléculaires élevés. C'est ainsi que plusieurs auteurs ont adopté des classifications des corps gras. À ce titre ADRIAN *et al* (1998) estiment que les graisses lauriques végétales ont des indices de réfraction compris entre : [1.448<R<1.458] et que les graisses végétales ont des indices compris entre [1.468<R<1.490].

OLLE (2002) avait proposé une classification des huiles en se basant sur leurs compositions en acide gras notamment l'acide oléique, acide linoléique, l'acide α -linoléique et leur indice de réfraction; ainsi selon cette classification les huiles dont l'indice de réfraction serait compris entre [1.468<R<1.472], seraient des huiles riches en acide oléique cas de l'huile de *L. usitatissimum* [IR=1.4595]. Les huiles de *C.colocynthis* [IR=1.4740] et *N.sativa* [IR=1.4720] seraient des huiles riches en acide gras linoléique [1.471<R<1.477].

Le contrôle analytique qualitatif des huiles est basé sur la détermination des indices chimiques caractéristiques (Indice de peroxydes, indice d'acide et l'acidité). La détermination de l'acidité constitue la première étape nous renseignant sur le degré d'altération des esters essentiellement des triglycérides présents dans le corps gras à la suite d'une hydrolyse chimique ou enzymatique. Il informe aussi sur la quantité des acides gras libres, qui sont responsables d'une plus grande facilité de l'huile à subir des altérations, notamment l'oxydation (**ADRIAN et al., 1998**).

Les résultats de détermination de l'indice d'acide de nos huiles nous ont permis de constater que l'huile de *L. usitatissimum* [**3.08 %**] et l'huile de *C. colocynthis* [**3.64 %**] sont en accord avec la norme des huiles consommables fixée par le *Codex Alimentarius* (**4 %**). Toutefois, **AKPAMBANG et al (2008)** avaient rapporté que l'huile de *C. colocynthis* issue des graines collectées du Nigeria a présenté un indice d'acide de [**8.02 ± 0.07 mg KOH/g**]. L'huile de *N. sativa* a présenté l'indice d'acide le plus élevé [**5.42 %**], cela est probablement dû à sa teneur en acides gras libres résultant de l'action des lipases sur les triglycérides, notons que cet enzyme est très abondant dans les graines de *N. sativa*. À l'encontre des résultats obtenus par le travail de **TAUSEEF (2009)** ayant révélé que l'huile de *N. sativa* possède un indice d'acide de l'ordre de [**0.34 mg KOH/g**]. Cette différence peut être allouée selon certaines études aux conditions environnementales, géographiques voire même la différence variétale de la plante.

L'indice de peroxyde donne une évaluation sur la qualité des peroxydes présents dans un corps gras. Cet indice permettra de démontrer si nos huiles ont été le siège d'oxydations plus ou moins importantes.

Les valeurs des indices de peroxydes obtenues pour les trois huiles étudiées sont en accord aux normes du *codex alimentarius* qui fixe une valeur inférieure à [**10 Meq d'O₂ actifs/kg de corps gras**] pour des huiles fraîches n'ayant subi aucune oxydation.

L'analyse des résultats obtenus pour les trois huiles à savoir l'huile de *C. colocynthis* [**1.17 Meq d'O₂ actif/kg de corps gras**], l'huile de *L. usitatissimum* [**4.74 Meq d'O₂ actif/kg de corps gras**] et l'huile de *N. sativa* [**6.02 Meq d'O₂ actif/kg de corps gras**], nous permet de constater que nos huiles n'ont pas subi d'oxydation permettant la formation de peroxydes et d'hydroperoxydes responsables d'altérer les huiles. L'huile de *N. sativa* a présenté une élévation de l'indice de peroxyde probablement due aux conditions d'extraction et de conservation. Ce constat a été

confirmé par les travaux de **GHEDIRA (2006)**, ayant obtenu un indice de peroxyde très élevé [**65 Meq d'O₂ actif/kg de corps gras**] pour l'huile *N.sativa*.

Selon l'hypothèse de **APPELBAUM (1989)** l'oxydation des huiles peut aussi être due à d'autres substances présentes dans les huiles telles que les caroténoïdes, les vitamines A et E, qui peuvent subir des réactions d'oxydation et donc induire un indice de peroxyde élevé.

L'indice de saponification peut nous renseigner sur la richesse d'une huile en acides gras à chaînes longues pour un poids donné de triglycérides, sur la qualité et la quantité des groupements carboxyliques liés, complexés ou présents dans les substances susceptibles de former un savon avec une base après hydrolyse. Cet indice dépend des poids moléculaires des acides gras entrant dans la constitution des triglycérides du mélange. Plus les molécules d'acides ont d'atomes de carbone, moins l'indice de saponification est élevé (**KARLESKING, 1992**). La quantité de potasse nécessaire à la saponification augmente donc avec la diminution de la longueur de chaîne des acides gras.

Le *Codex Alimentarius* fixe pour l'indice de saponification un intervalle de [**170 – 265 mg KOH/g d'huile**] pour les huiles brutes. Dans la présente étude, les trois huiles inspectées ont enregistré des valeurs moyennes de [**159.0435, 170.544 et 219 mg KOH/g d'huile**] respectivement pour l'huile de *L. usitatissimum*, l'huile de *N. sativa* et l'huile *C. colocynthis*. Ce constat est synonyme d'une bonne qualité de ces huiles. Ces résultats sont en ligne avec ceux de l'indice de saponification des huiles de *C. colocynthis* étudiées au Soudan et en Malaisie **206 et 204.44 mg KOH/g d'huile** respectivement. Ces valeurs sont aussi dans le même ordre de grandeur que ceux trouvés par (**OBEID, 1996 ; ZIYADA, 2008 ; GIWA et al., 2010**).

Selon **AFNOR (1988)**, la fraction insaponifiable, qui représente **0.2 à 2 %**, est formée de constituants naturels non glycéridiques des matières grasses, extractibles par les solvants organiques (hexane, éther, etc.), tels les stérols, les alcools aliphatiques supérieurs, les pigments, les hydrocarbures, les vitamines liposolubles, ainsi que les substances organiques étrangères non volatiles à **103 °C** qu'elles peuvent éventuellement contenir. Certaines d'entre elles peuvent être très utiles et participent davantage à la stabilité de l'huile contre l'oxydation, comme le cas des tocophérols et les caroténoïdes. Par contre, d'autres matières insaponifiables peuvent avoir des répercussions négatives sur la qualité de l'huile.

L'analyse des résultats de l'indice insaponifiable montre que celui-ci a été de l'ordre de [2.26, 1.7, 3.47 %] respectivement pour l'huile de *C. colocynthis*, *L. usitatissimum* et l'huile de *N. sativa*. Ces valeurs sont légèrement supérieures à la norme requise par l'AFNOR particulièrement pour l'huile de *C. colocynthis*. En effet, certains chercheurs (ABU NASR, 1953 ; OBEID, 1996) ont trouvé que l'huile de *C. colocynthis* ne renfermait que 1,01 % à 1,72 % d'insaponifiable. Il est à noter que l'huile de *N. sativa* dépasse largement la norme AFNOR cette différence peut-être attribuée à la variété de l'espèce des graines de *N. sativa* étudiée.

L'indice d'iode nous a permis de mesurer globalement le degré d'insaturation d'un corps gras. Nos résultats d'indice d'iode montrent qu'il y'a une différence de pourcentage d'insaturation entre les concentrations C et C* de chaque huile. Ce dernier a été mis en évidence par l'étude viscosimétrique, cette étude montre que la chaîne à C* est plus étirée que possible, ce qui permet la liaison d'iode sur toutes les insaturations présentes dans la chaîne. Ceci est indiqué par la valeur importante de l'indice d'iode par rapport à la concentration $8.18.10^{-2} \text{ g/ml}$. Cette concentration se trouve dans la zone $C > C^*$ qui traduit l'effondrement de la chaîne macromoléculaire. En effet, au cours de l'effondrement de la chaîne, les sites pouvant créer des insaturations avec l'iode vont être cachés par le réarrangement moléculaire.

L'estérification préalable de nos huiles nous a permis d'obtenir des rendements variables allant de [29.03 % à 37.44 %], où l'ester de l'huile de *L.usitatissimum* a donné le meilleur rendement. Ces rendements reflètent la richesse de nos huiles en esters et en acides gras.

La purification de nos esters bruts par la chromatographie sur colonne de gel de silice, a été effectuée avec succès où on a pu obtenir des rendements en esters majoritaires variant de 56.8 % à 82.2 % où le *L. usitatissimum* a présenté encore une fois le meilleur rendement [82.2 %], ceci a été confirmé par la détermination viscosimétrique, constat bien apparent après détermination des concentrations C* de l'huile et celle de l'ester majoritaire de l'huile de *L. usitatissimum*, où la différence entre ces deux est minime par rapport à cette dernière des deux autres huiles (HN et HC).

L'étude des comportements viscosimétriques des macromolécules nous permet de bien étudier leurs structures, ainsi de prédire leurs orientations et liaison et autre réaction due à leurs structures. La viscosité est une méthode simple à mettre en œuvre et renseigne sur les variations de la conformation des macromolécules en solution. En effet la viscosité réduite et

l'indice limite de viscosité sont liés au volume hydrodynamique des macromolécules en solution et les informations ainsi obtenues reflètent l'existence d'associations soit intermoléculaires soit intramoléculaires. La variation de la viscosité avec la concentration a fait l'objet de nombreuses études et plusieurs modèles empiriques ou théoriques ont été proposés. Le modèle le plus simple pour décrire les propriétés d'une macromolécule linéaire isolée en solution consiste à négliger toutes les interactions et à considérer la chaîne seule comme une succession de maillons orientés de façon aléatoire (**MALLO et al., 1999**). **Edwards (BENMANSOUR et al., 2003)** a résumé le comportement d'une chaîne macromoléculaire comme suit :

Notre étude a porté sur l'effet de la concentration de trois huiles ainsi leurs esters (lin, nigelle, coloquinte) sur le comportement viscosimétrique. Le premier constat émis à partir des graphes de la viscosité spécifique des trois huiles et leurs esters une variation croissante de la viscosité spécifique en fonction de la concentration d'huile ou d'ester. Cette variation a lieu en plusieurs intervalles de concentration. La viscosité d'huile et d'ester respectivement augmente fortement quand la concentration diminue, de ce fait, la courbe se divise en trois intervalles de concentration bien distingués. En effet, on distingue trois régimes : $C < C^*$, $C = C^*$, $C > C^*$.

Le volume offert à une chaîne dans le domaine — $C < C^*$ est supérieur à l'espace occupé par la même chaîne ce qui se traduit par une chute importante de la viscosité réduite quand la concentration diminue (**FLORY et al., 1954**).

Dans le domaine où $C = C^*$, l'on note que la flexibilité de la chaîne permet des allongements de la chaîne (le volume offert à la chaîne est égal à son volume exclu - espace moléculaire-). Flory-Huggins (**JIMENEZ-REGALADO et al., 1999**) a montré que l'effet d'allongement de la chaîne macromoléculaire fait augmenter la viscosité. Ce qui explique que la viscosité réduite est importante. Cet effet peut être expliqué par le comportement de la chaîne macromoléculaire comme étant totalement isolée des autres chaînes qui l'entourent, ces dernières se touchent par leurs volumes exclus. Ce phénomène permet de bien expliquer la croissance exponentielle de la viscosité réduite d'une huile (**ALLOUCHE et al., 2003**). Dans notre cas ce phénomène est accompagné par l'effet d'auto-associations des chaînes de Polyester de glycérol présentes le long de la chaîne macromoléculaire. Sous l'effet de la température, nous avons remarqué que ces dernières s'auto associent (**SELB et al., 2000**). La chaîne obéit à la statistique gaussienne ce qui a été montré dans le graphe de $\eta = f(C)$, la viscosité diminue en fonction de la température (**BENMANSOUR, 2004**).

En fin dans le dernier domaine $C > C^*$ le volume offert à la chaîne macromoléculaire est inférieur à son propre volume exclu. Ceci est expliqué par l'augmentation de la concentration en huile d'où l'on note le début d'enchevêtrement des chaînes macromoléculaires. Ce phénomène est expliqué par le début de réarrangement des chaînes entre elles (les chaînes vont former un réseau temporaire. En effet lorsqu'on augmente la concentration d'huile, on passe d'un régime dilué, où les chaînes sont isolées, à un régime semi-dilué, où les chaînes s'enchevêtrent. Dans ce dernier régime, les chaînes sont impénétrables et forment un réseau temporaire. Edwards (**BENMANSOUR et al., 2003**), dans cet intervalle montre qu'on a un effet écranage inter et intramoléculaire ce qui explique la petite différence de viscosité. En effet les solutions semi-diluées de macromolécules ont été analysées d'un point de vue théorique par plusieurs auteurs, mais jamais mis en évidence en pratique cependant l'existence des phases ordonnées (comme un arrangement hexagonal de bâtonnets) a été proposé dans un domaine de concentration voisin de C^* , un tel régime n'a aucune preuve expérimentale.

Cette étude nous a permis de mettre en évidence ce domaine pour nos huiles et esters à l'échelle expérimentale, ce qui nous a permis de bien comprendre leurs comportements. De par l'étude viscosimétrique et par la théorie de Flory, nous avons pu déterminer les masses moyennes en poids des chaînes macromoléculaires des huiles et des esters respectivement. Et celui en extrapolant les courbes de la viscosité $\eta/C=f(C)$ à l'origine, nous remarquons que l'huile de nigelle a une grande masse de $2.25 \cdot 10^{-8}$ mg/ml et l'ester de Lin pour les esters avec une masse de $11.5 \cdot 10^{-5}$ mg/ml. Les graphes de $\eta/C=f(C)$ montrent que, ces huiles et celles des esters en solution montrent un comportement analogue que celui des polyélectrolytes (**SHALABY, 1991**).

En ce qui concerne la viscosité des différentes formules de synergie des huiles, l'on note la présence de deux zones. Il est préconisé donc pour avoir un bon effet de ces combinaisons synergiques des huiles ou ester, d'opérer des mélanges à concentrations C^* , afin de confondre leur rhéologie et augmenter leurs synergies. L'absorbance dans l'UV peut fournir des indications sur la qualité d'une matière grasse, sur son état de conservation, et sur les modifications dues aux processus technologiques. L'oxydation d'une huile aboutit à une dégradation en chaîne des acides gras insaturés par l'oxygène atmosphérique sous l'effet de différents facteurs exogènes et endogènes initiateurs, accélérateurs ou retardateurs, conduisant à des produits oxydés volatils ou non. Si l'oxydation se poursuit, il se forme des produits secondaires d'oxydation (**TANOUTI et al., 2010**).

En vue de détecter le degré d'insaturation présent dans les différentes huiles et leurs esters, une étude de l'absorbance l'UV-visible à une longueur d'onde de 250 nm. Les résultats concrétisés dans les courbes de l'absorbance UV-visible révèlent la présence des sites d'insaturation à une concentration de $2.81 \cdot 10^{-7}$ mg/ml pour toutes les huiles. Pour ce qui est des esters, l'on a noté un degré d'insaturation élevé pour l'ester de lin à une concentration de $1.56 \cdot 10^{-7}$ mg/ml. Ceci peut être commenté par la longueur de la chaîne macromoléculaire de l'ester de Lin par rapport aux autres esters des huiles investigués.

La spectroscopie infrarouge est l'un des outils spectroscopiques les plus utilisés pour la caractérisation des molécules (ROUESSAC et al., 1998). Dans notre étude, nous avons fait recours à cette technique pour confirmer d'une part, la réaction d'estérification des acides gras, et d'autre part, pour détecter les différentes fonctions dans nos esters et huiles. L'analyse des spectres d'infrarouge de nos huiles et esters majoritaires a révélé la présence de plusieurs pics caractéristiques de chaque fonction, dont les plus importants sont les suivants :

Pour les huiles, les pics **3459.18**, **3459.18** et **3464.64 cm⁻¹** correspondent à la bande de vibration d'élongation des (OH) des acides carboxyliques respectivement de **HN**, **HC** et **HL**. Les pics vers **3000.30** à **3005.77 cm⁻¹** correspondent à la bande de vibration d'élongation de (C=C-H) de nos huiles, l'intensité du pic donne une idée sur le nombre des insaturations. Les pics situés vers **2918.36**, **2836.42** et **2847.34 cm⁻¹** des spectres de nos huiles, sont attribués aux bandes de vibration d'élongations symétriques et asymétriques des groupements (CH₂) et (CH₃). Les pics à **1738.39** et **1743.85** de nos spectres représentent des pics typiques à la bande de vibration d'élongations du groupe (C=O) de l'ester. Cette bande et celle du (OH) de l'acide carboxylique confirme, quant à eux, la présence des esters et des acides gras dans nos huiles. Le pic **1700.15** est attribué à la bande de vibration d'élongation du groupe (C=O.) de l'acide carboxylique. En revanche, les pics **1650.99** et **1645.52 cm⁻¹** sont typiques à la bande de vibration d'allongement du groupe (-C=C-). **1465.25** et **1372.38 cm⁻¹** correspondent aux bandes de vibrations de déformation des groupes (CH₂) et (CH₃). On observe aussi la présence des pics **1159.33** et **1170.26 cm⁻¹** qui sont caractéristiques des bandes de vibrations d'allongement du groupe (C-O) de l'ester et pour l'acide carboxylique.

En ce qui concerne des spectres des esters majoritaires, on a observé la persistance des traces de l'acide indiquées par les pics vers **3459.18** et **3453.72 cm⁻¹**. Ceci peut être expliqué par le fait que la réaction d'estérification n'était pas complète. Les pics **3005.77** et **3000.30 cm⁻¹**

correspondent à la bande de vibration d'allongement des groupements (**C=C-H**). Les pics **2918.36** et **2847.34** des spectres de nos esters sont typiques des bandes de vibration d'allongement des groupements (**CH₂**) et (**CH₃**). Les pics intenses situés vers **1738.39** et **1732.93 cm⁻¹** correspondent à la bande de vibration d'allongement du groupe (**C=O**) de l'ester. Les pics typiques à la bande de vibration d'élongation des groupes (**-C=C-**) présents dans nos esters sont situés vers **1656.45** et **1640.06 cm⁻¹**. Concernant les pics situés vers **1459.79** et **1437.94** sont des pics caractéristiques aux bandes de vibration de déformation des groupes (**CH₂**) et (**CH₃**) de nos esters. En revanche, les pics **1164.80** et **1170.26 cm⁻¹** correspondent aux bandes de vibrations d'élongation des groupes (**C-O**) des esters.

La RMN, méthode spectroscopique est mise en œuvre pour la caractérisation de nouvelles molécules, elle est utilisée comme outil d'élucidation structurale mais aussi comme outil d'analyses des mélanges sans purification préalable (**OTTAVIOLI, 2009**). Cette méthode est très reconnue pour sa fiabilité en partie grâce à la RMN ¹H et RMN ¹³C qui apportent des informations extrêmement précieuses sur le squelette carboné de la molécule (**ROUESSAC et al., 1998**). La RMN a été utilisée pour confirmer l'identification des constituants préalablement identifiés ou dont la présence est suspecté par une autre technique généralement la CPG-SM.

Dans notre étude, les résultats de cette technique nous ont permis de constater que la réaction d'estérification s'est bien déroulée, la lecture des tracés spectroscopique RMN ¹H corrobore les résultats de la CPG-SM de par le nombre et la nature des protons méthyliques et leurs déplacements chimiques (déplacement vers 3.6 ppm). La présence des insaturations a aussi été mise en évidence par l'apparition des signaux entre 5.26 – 5.30 ppm attribués aux protons vinyliques.

Les résultats de la RMN ¹³C viennent renforcer le premier constat préalable préétabli par la première méthode, en effet nous n'avons pas pu déterminer avec exactitude le nombre de carbone car la fraction analysée correspond à un mélange de quatre produits. En revanche, cette technique d'analyse, nous a permis de confirmer le déroulement de la réaction d'estérification par l'apparition d'un signal à 174 ppm attribué au carbone du carbonyle de l'ester (**COOCH₃**). De même, l'analyse des déplacements chimiques, nous ont permis de détecter les différents carbones à savoir les carbones primaires, secondaires voir même tertiaires. Cette technique nous a aussi renseignée sur la présence des insaturations via les déplacements chimiques situés entre (127,90 ; 128,04 ; 129,74 ; 130,03 et 130,20 ppm).

En conclusion, nous pouvons dire que Les analyses effectuées montrent que les huiles étudiées contiennent à la fois des acides et des esters d'acides gras. Les spectres CG révèlent clairement que les huiles et les esters séparés referment un produit majoritaire accompagné de d'autres composés. Les données spectrales IR, RMN.¹H et RMN.¹³C confirment que la réaction d'estérification des huiles s'est bien déroulée, en plus, les esters séparés sont insaturés (contiennent des doubles liaisons). Afin d'élucider leurs structures chimiques exactes, il nous reste à purifier ces esters et les analyser par la suite. Par ailleurs, il est à signaler que les analyses RMN effectuées ne nous ont pas fourni les informations escomptées. En effet la solution analysée s'avère être un mélange d'esters d'acides gras et il est plus que préférable d'effectuer des analyses complémentaires telles la RMN bidimensionnelle.

Chapitre 4

*Activités antifongiques des
huiles et de leurs esters*

CHAPITRE 4

ACTIVITES ANTIFONGIQUES DES HUILES ET DE LEURS ESTERS

4.1 Introduction

Avec l'évolution de la société, le consommateur est devenu plus soucieux de sa sécurité alimentaire, et il demande à être protégé de mieux en mieux contre les risques de contamination (**ELKHOURY, 2007**). L'alimentation, qu'elle soit d'origine hydrique, végétale ou animale, doit répondre à des critères de qualité, entre autres la sécurité sanitaire. La nature des dangers peut être diverse : Chimique : plomb, mercure, pesticide, etc., et biologique : phycotoxines, moisissures, mycotoxine. En effet, la présence d'éléments tel que le plomb, de molécules telles que les allergènes, ou encore la présence de particules virales constituent une source de danger tout comme la contamination par les champignons y compris les moisissures.

Les champignons sont des organismes hétérotrophes : ils vivent aux dépens de la matière organique qui leur fournit l'énergie et le carbone dont ils ont besoin. Les moisissures, champignons microscopiques, comportent plusieurs dizaines de milliers d'espèces. Elles synthétisent des enzymes, des antibiotiques et d'autres substances très diverses, ce qui en fait des « usines chimiques », au fonctionnement complexe, sous la dépendance de nombreux facteurs encore mal connus.

Les organismes fongiques, et grâce à leurs spores, se disséminent très facilement, peuvent causer des mycoses, des allergies ou altérer les produits alimentaires. Elles peuvent alors envahir toutes sortes de produits alimentaires, y compris du blé stocké en silo. Par défaut d'apparence, mauvais goût ou ce qui est parfois plus grave, production de mycotoxines. Et malgré les controverses sur l'ampleur de leurs effets sur la santé, ces toxines fongiques constituent désormais un problème sanitaire majeur.

Les champignons, ou les mycètes, sont des organismes eucaryotes unis - ou pluricellulaires, incluant des espèces macroscopiques (macromycètes) et d'autres microscopiques (micromycètes) d'aspect filamenteux ou lévuriforme. Ces derniers peuvent devenir visibles lorsque leur développement est important. Ces champignons sont appelés couramment « moisissures », véritables agglomérats de filaments mycéliens et d'organes fructifères capables de coloniser des substrats très divers (végétaux, papier, cuir, murs...). Il s'agit d'organismes hétérotrophes (nécessitant une source de carbone et d'azote pour leur développement) et ubiquistes.

Une caractéristique majeure des champignons est leur mode de reproduction ; ils produisent un grand nombre de spores, ce qui leur assure un pouvoir de contamination considérable. Les spores sont issues de plusieurs modalités de reproduction sexuée ou asexuée qui représentent le principal critère de leur classification.

L'identification des très nombreuses espèces fongiques susceptibles de coloniser les aliments et d'en altérer les qualités voire de produire des mycotoxines est une étape indispensable à l'évaluation du risque mycotoxique.

Cette identification a pendant longtemps été exclusivement basée sur l'observation des caractères cultureux et morphologiques de l'espèce. Les progrès récents de la biologie moléculaire ont permis de proposer des outils d'aide à l'identification. Toutefois, la complexité du règne fongique fait qu'à l'heure actuelle, ces outils ne peuvent pas encore remplacer complètement l'examen morphologique, qui reste la base de l'identification.

L'identification d'une espèce fongique repose sur l'analyse de critères cultureux (température et vitesse de croissance, milieux favorables) et morphologiques. Ces derniers sont constitués des paramètres macroscopiques (aspect des colonies, de leur revers) et microscopiques (aspect du mycélium, des spores, des phialides, des conidiophores...) (CAHAGNIER & RICHARD-MOLARD, 1998).

L'aspect des colonies représente un critère d'identification. Les champignons filamenteux forment des colonies duveteuses, laineuses, cotonneuses, veloutées, poudreuses ou granuleuses parfois certaines colonies peuvent avoir une apparence glabre (l'absence ou pauvreté du mycélium aérien).

Le relief des colonies : il peut être plat ou plissé et la consistance des colonies peut être variable (molle, friable, élastique ou dure). La taille des colonies : Elle peut être très variable en fonction des genres fongiques : petites colonies (*Cladosporium*) ou, au contraire, colonies étendues, envahissantes (*Mucor*, *Rhizopus*).

La couleur des colonies est un élément très important d'identification ; les couleurs les plus fréquentes sont le blanc, la crème, le jaune, l'orange, le rouge allant jusqu'au violet ou la bleue, le vert, le brun allant jusqu'au noir. Les pigments peuvent être localisés au niveau du mycélium (*Aspergillus*, *Penicillium*) ou diffuser dans le milieu de culture (*Fusarium*). Les structures de fructification : la présence ou l'absence, au centre de la colonie, des structures de fructification sexuée (cléistothèces) ou asexuée (pycnides) est aussi un élément important de diagnose (**BOTTON et al., 1990**).

L'identification d'espèces fongiques est traditionnellement fondée sur les caractéristiques culturelles et morphologiques macroscopiques et microscopiques. Cette identification nécessite donc, en général, plusieurs jours de culture (7 à 10 jours le plus souvent). La culture sur des milieux spécifiques peut être nécessaire pour obtenir la formation de conidies et, dans certains cas, l'absence d'apparition de conidies rendra impossible l'identification du mycélium. Par conséquent, de nombreuses études ont visé à développer des méthodes outils d'identification reposant sur l'étude des acides nucléiques (ADN et ARN) et ne nécessitant plus obligatoirement un examen morphologique (**PETERSON, 2006 ; HINRIKSON et al., 2005 ; FEUILHADE, 2005 ; JIN et al., 2004 ; REISS et al., 1998**).

Les méthodes les plus intéressantes sont basées sur l'amplification par PCR (polymerasechainreaction) de certaines régions spécifiques comme le gène codant pour la sous-unité 28S ribosomale (région D1-D2) et des régions ITS1 et ITS2 (**HINRIKSON et al., 2005**).

L'identification moléculaire d'espèces fongiques est, à l'heure actuelle, surtout appliquée en mycologie médicale pour différencier les espèces d'intérêt. En effet, les infections fongiques envahissantes sont de plus en plus identifiées comme cause primaire de morbidité et de 23 mortalités, particulièrement chez les immunodéficients (**DE AGUIRE et al., 2004**). L'identification moléculaire peut permettre une différenciation rapide des

différentes espèces d'*Aspergillus* ainsi que celle d'autres moisissures ou levures, pathogènes opportunistes (DIAL, 2007 ; DE AGUIRE et al., 2004 ; SCHABEREITER-GURTNER et al., 2007 ; PATERSON et al., 2003). Les sondes d'oligonucléotide, dirigées vers la région ITS 2 de l'ADN ribosomal de l'*Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. ustus*, et *A. versicolor* ont permis la différenciation de 41 isolats et n'ont donné aucune réaction faussement positive avec 33 espèces d'*Acremonium*, *Exophiala*, *Candida*, *Fusarium*, *Mucor*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Rhizopus*, ou d'autres espèces d'*Aspergillus* (DE AGUIRE et al., 2005). Cette méthode est aussi utilisée pour différencier et identifier les moisissures responsables de l'altération des aliments, principalement les espèces de *Penicillium* (BOYSEN et al., 2000 ; HAGESKAL et al., 2006). En ce qui concerne les *Fusarium*, les méthodes moléculaires existantes donnent des résultats fréquemment peu concluants et l'examen morphologique classique semble encore une méthode indispensable à l'identification des espèces appartenant à ce genre fongique (HEALY et al., 2005). De nombreux travaux visent aussi à utiliser les progrès de la biologie moléculaire afin de dépister rapidement les souches fongiques toxigènes (NIESSEN, 2007). Si à l'heure actuelle les outils d'identification moléculaire ne semblent pas en mesure de remplacer l'identification morphologique classique, il est probable que dans les années à venir, ces méthodes représenteront des outils particulièrement utiles pour la détection et l'identification fongique dans les aliments.

Deux groupes de champignons (ou moisissures) toxigènes (producteurs de mycotoxines) peuvent être distingués. Le premier type est constitué de champignons envahissant leur substrat et produisant les mycotoxine sur plantes sénescences ou stressées : il sera question de toxines de champs. L'autre groupe rassemble ceux qui produisent les toxines après récolte ; on les qualifiera de toxines de stockage. Ainsi, des champignons du sol ou des débris de plantes peuvent disséminer leurs spores sur la plante ou les grains puis proliférer pendant le stockage si les conditions le permettent.

Les moisissures toxigènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides dès l'instant qu'il y a des éléments nutritifs et de l'humidité (activité en eau supérieure à 0,6), d'où la grande variété des substrats alimentaires contaminés. Actuellement, il existe plus de 300 métabolites secondaires fongiques recensés

mais seule une trentaine posséderait des caractéristiques toxiques préoccupantes (**PFOHL-LESZKOWICZ, 1999**).

Les mycotoxines sont des produits du métabolisme secondaire doués de potentialités toxiques à l'égard de l'homme et des animaux, elles retiennent l'attention dans le monde entier en raison des pertes économiques importantes qui sont liées à leurs effets sur la santé de l'homme, la productivité animale et le commerce national et international(**TOZLOVANU, 2008**).

Le métabolisme secondaire, dont les mycotoxines sont issues, diffère du primaire par la nature aléatoire de son activation, la diversité des composés formés et la spécificité des souches impliquées. Il n'est pas lié à la croissance cellulaire mais répond généralement à des signaux issus de l'environnement du champignon (**PALOT et al., 2009**).

Les mycotoxines sont considérées comme faisant partie des contaminants alimentaires les plus significatifs en termes d'impact sur la sécurité alimentaire et la santé publique (**PITT et al., 2000; LOPEZ-GRIO et al., 2010**), soit directement lorsqu'elles sont présentes dans l'alimentation humaine, soit de manière indirecte lorsqu'elles contaminent la chaîne alimentaire via l'alimentation du bétail (**RUPPOL-DELFOSE & HORNICK, 2004**).

L'un des outils pour maîtriser les risques pour la santé humaine liés à la contamination de la chaîne alimentaire par les mycotoxines est la mise en place des réglementations et des législations adoptées, basées sur une évaluation scientifique de nos connaissances dans ce domaine (**CASTEGNARO et PFOHL-LESZKOWICZ, 2002**).

Il est certain que même avec tous les efforts possibles, dans certaines conditions notamment climatiques, la contamination des aliments par les moisissures et les mycotoxines est inévitable (**FANGEAT, 2008**). Pour cette raison la mise en point des solutions concrètes et le développement d'un programme d'action pour mieux gérer les risques liés à la présence de la flore fongique et leurs toxines dans les aliments (**FORTIER & TURGEON, 2008**) sont devenus l'un des objectifs majeurs pour maintenir l'approvisionnement mondial en aliments (**LOPEZ-GARCIA, PARK & GUTIERREZ, 1999**).

La prévention des risques de contamination des produits alimentaires par les moisissures et les mycotoxines constitue un défi majeur pour les intervenants dans les chaînes agroalimentaires (**DURIS, 2000**). Diverses stratégies peuvent exister afin d'essayer de limiter le développement fongique ainsi la production des mycotoxines au champ, à la récolte et lors du stockage (**BEJAOU, 2005**) et malgré toutes les précautions qui seront prises pour prévenir la présence de la flore fongique et leurs toxines via les aliments, des accidents surviendront encore, car il est impossible en matière de sécurité alimentaire de garantir un risque zéro (**BUISSON & DAVOUST, 2008**).

Le problème de réduction des mycotoxines est plutôt complexe, plusieurs méthodes ont été proposées en s'attaquant au développement des moisissures (activité antifongique) (**CANET, 1999**). Lorsqu'on parle d'une activité antifongique, on distingue deux sortes d'effets : une activité létale ou fongicide et une inhibition de la croissance ou activité fongistatique.

Depuis les années 90, l'arsenal antifongique est en pleine évolution. De nouvelles molécules possédant de nouveaux mécanismes d'action ont été développées. La caspofungine agit par inhibition non compétitive de la synthèse de 1,3- β -D-glucane, qui est un polysaccharide essentiel de la paroi des agents pathogènes fongiques. L'inhibition de la synthèse du glucane est à l'origine d'une instabilité osmotique et de la lyse de la membrane fongique (**DIFFINE, 2003**).

Amphotéricine B agit par fixation sur une fraction stérolique de la membrane du champignon, provoquant des modifications de la perméabilité membranaire (**GANTIER, 2007**). La 5-fluorocytosine est un analogue de nucléotide qui inhibe la synthèse des acides nucléiques, la grisofulvine perturbe l'agrégation des microtubules durant la mitose et les azoles inhibent la synthèse de l'ergostérol (**MADIGAN & MARTINKO, 2007**).

À côté de ces antifongiques synthétiques connus, différentes plantes sont caractérisées par la synthèse des substances actives appartenant majoritairement d'une part, aux métabolites secondaires tels les polyphénols, les huiles essentielles, les alcaloïdes, etc. Et d'autre part, aux métabolites primaires telles les huiles fixes (**MEUNIER, 2003**). Incite de nombreux chercheurs à étudier leurs effets antimicrobiens notamment antifongiques.

L'importance indiscutable des plantes médicinales, leur contenu et la nature chimique de leurs constituants leur confèrent de grandes perspectives d'application. Dont approximativement 20% de celles-ci a été analysée pour une activité antimicrobienne. Malgré cela, un large spectre de classe des composés a été purifié et a démontré des propriétés antifongiques (**DE LUCCA et al., 2005; MARZOUK et al., 2009**).

L'efficacité antifongique de ces substances est essentiellement due à la composition de celles-ci en molécules bioactive variées appartenant à différentes classes chimiques, pouvant être mises à profit pour réduire la flore fongique contaminante(**OURAÏNI et al., 2005**).

L'activité antifongique des extraits des plantes a fait l'objet d'un grand nombre de publications à l'échelle internationale. Cependant, la majorité des travaux cités dans ces publications s'arrêtent au niveau de la mise en évidence de l'activité antifongique de ces extraits. Les études sur les mécanismes d'action de cette activité sont en nombre négligeable. Dont on note l'absence de travaux approfondis relatifs à celles-ci.

Dans cette partie nous avons étudié l'activité antifongique des huiles extraites des plantes sur des souches d'*Aspergillus* producteurs de mycotoxines en autre *Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus*.

Dans cette partie nous exposerons en premier lieu les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique des huiles extraites des graines de *Citrullus colocynthis* L, *Nigella sativa* L et *Linium usitatissimum* L. Dans un second temps, nous évoquerons l'effet antifongique des esters majoritaires extraits des huiles sur les souches fongiques étudiées.

4.2 Résultats

4.3 Confirmation de l'identité des souches testées

Les résultats des techniques d'identification des souches fongiques étudiées (microculture et single spore) résumés dans le tableau 3.1 confirment l'appartenance de nos souches au genre *Aspergillus* et à l'espèce *A.flavus* et *A.ochraceus*.

Les figures 3.1 et 3.2 donnent quelques spécimens de photos de nos souches sur les différents milieux d'identification.

Tableau 4.1 Identification des espèces *Aspergillus* (single spore)

GENRES ESPECES	MILIEU	LECTURE	
		COULEUR	Diamètre en mm
<i>Aspergillus flavus</i>	MEA 25°C	VERT PISTACHE	58
	CYA 37°C	MARRON FONCE	52
	CYA 5°C	/	o Germination
	G25N 25°C	JAUNE VERDATRE	50
	AFAP	BLANC+ REVERS ORANGE	48
<i>Aspergillus ochraceus</i>	MEA 25°C	JAUNE DORE	70
	CYA 37°C	JAUNE	53
	CYA 5°C	BEIGE	20
	G25N 25°C	JAUNE PALE	55

4.4 Test de mycotoxinogénie

La prospection de la plaque des différents isolats du milieu YES réalisée pour la confirmation mycotoxinogénique par séparation chromatographique sur couche mince à révéler la présence sous UV 365nm de spots fluorescentes bleu foncée et bleu claire caractéristiques des AFB et des OTA. Les spots ont eu le même Rf que les standards usités. Figure 3.3.

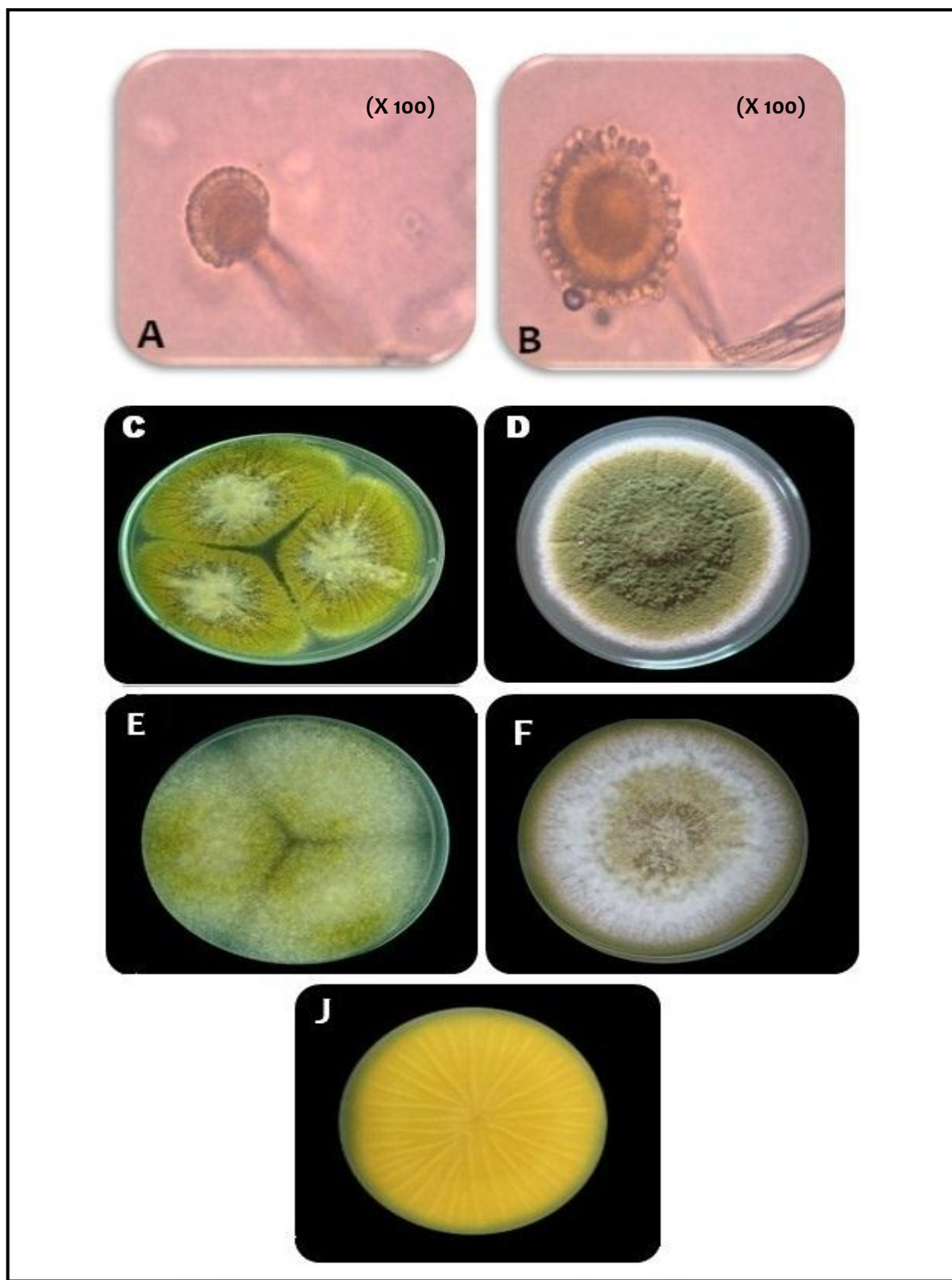


Figure 4.1 A, B : *Aspergillus flavus* sous microscope(x100), *Aspergillus flavus* par méthode de single spore C : sur milieu CYA à 37°C D : sur milieu MEA à 25°C, E : sur milieu G25N à 25°C, F : sur milieu AFAP à 25°C, J : sur AFAP reverse plate orange.

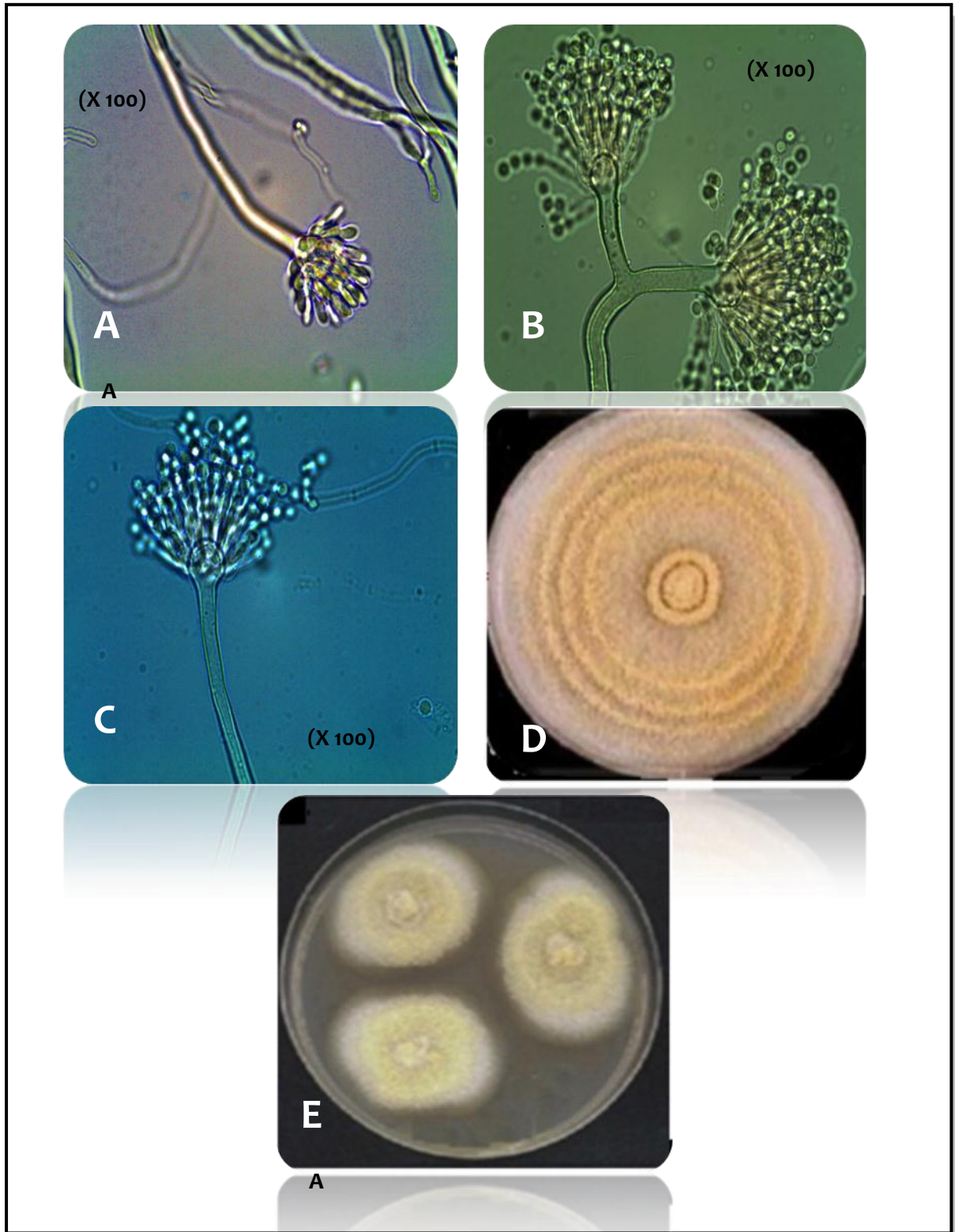


Figure 4.2 Specimens de photos d'*Aspergillus ochraceus*
A,B, C: photos sous microscope (x100);
D : sur milieu MEA à 25°C, **E :** sur milieu CYA à 37°C.

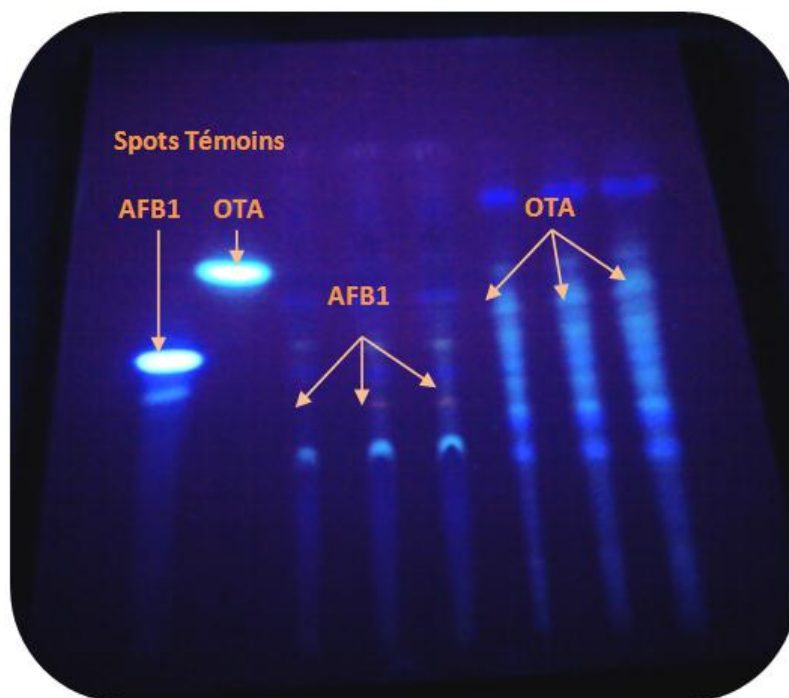


Figure 4.3 Chromatographie sur plaque des différents isolats des souches testées sur milieu YES

4.5 Evaluation de l'activité antifongique des huiles

La problématique de détérioration des denrées alimentaires par des champignons microscopiques (moisissures) suscite un intérêt grandissant depuis quelques dizaines d'années. Au vu des exigences de la sécurité alimentaire et dans le but de palier aux problèmes de contamination fongique, de nombreux chercheurs se sont orientés vers des alternatives de réductions ou de luttes contre cette contamination, telle la lutte naturelle fondée sur l'utilisation des différents extraits des plantes médicinales en vue d'une contribution à leur valorisation, en raison de leurs efficacités, innocuités et de leurs coûts moins élevés par rapport aux autres méthodes de réductions.

4.5.1 Croissance radiale sur milieu solide

À fin d'évaluer l'activité antifongique de nos huiles *Citrullus colocynthis* L., *Nigella sativa* L. et *Linum usitatissimum* L. et de connaître la qualité et l'implication de ces huiles dans la réduction de la flore fongique productrice de toxines, un suivi de la croissance radiale mycélienne durant 7 jours d'incubation en moyenne. L'évaluation de la croissance radiale a été réalisée sur milieu PDA acidifié (méthode décrite par **TCHANG et al., 2000**).

La lecture sommaire des différents supports graphiques donnant l'effet des huiles testées sur les souches étudiées montre qu'en général les huiles ont exercés un effet antifongique variable sur les souches d'*Aspergillus*. Cet effet a été différent d'une huile à une autre et d'une souche à une autre. En général, les huiles investiguées ont eu un pouvoir antifongique plus marqué sur la souche d'*Aspergillus flavus* que sur *Aspergillus ochraceus*.

4.5.1.1 Résultats du test préalable de l'activité antifongique

Les résultats obtenus témoignent d'une activité antifongique plus au moins efficace pour les trois huiles contre les souches testées. La lecture globale des différents résultats collectés et consignés dans les supports graphiques figures 4.4, 4.5 et 4.6, affichent un retard de la croissance mycélienne proportionnel à la concentration de l'huile ajoutée au milieu. IL faut noter que ces huiles ont été efficaces sur la souche *A.flavus* et n'ont démontré aucun effet sur la souche *A.ochraceus*.

La lecture des moyennes des diamètres de la croissance de la souche *A.flavus* sous l'effet des différentes concentrations d'huile de *Citrullus colocynthis* démontre la capacité de cette huile à réduire la croissance radiale mycélienne, exception faite au niveau du 6^{ème} jour d'incubation où l'on note une légère fluctuation de la croissance mycélienne à la concentration 100 µl/ml. Les meilleurs indices antifongiques enregistrés ont été à 300 µl/ml la figure 4.4 concrétise ces résultats.

L'huile de *Linum usitatissimum* a présenté l'indice antifongique le plus élevé 39.88 -43.88 % respectivement sur les concentrations 275 et 300 µl/ml par rapport aux deux autres huiles. Suivant ces données on peut classer l'ordre d'efficacité de l'activité antifongique de ces huiles décroissante comme suit: huile de *Linum usitatissimum* > huile de *Citrullus colocynthis* > huile de *Nigella sativa*.

L'huile de *Nigella sativa* à également contribué au pouvoir antifongique exercé sur la souche *Aspergillus flavus* testée. Il est à noter une légère fluctuation de la croissance mycélienne lors du 6^{ème} et 7^{ème} jour respectivement pour les concentrations 100 et 200 µl/ml. L'analyse de ces résultats nous a permis d'escompter que les indices antifongiques de nos huiles se sont échelonnés entre 26 et 28 % pour les concentrations 250, 275 et 300 µl/ml figure 4.6.

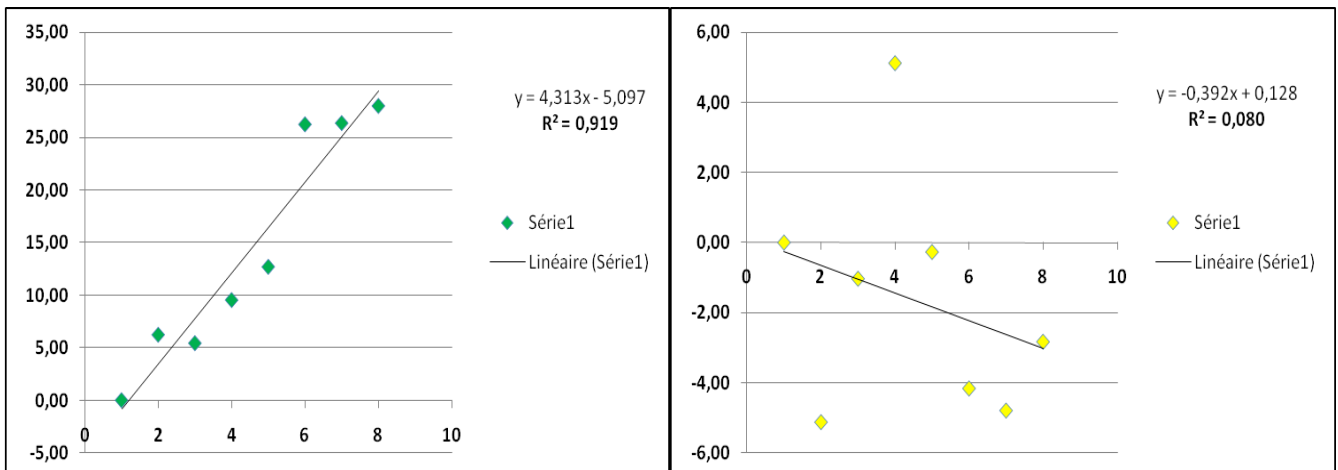
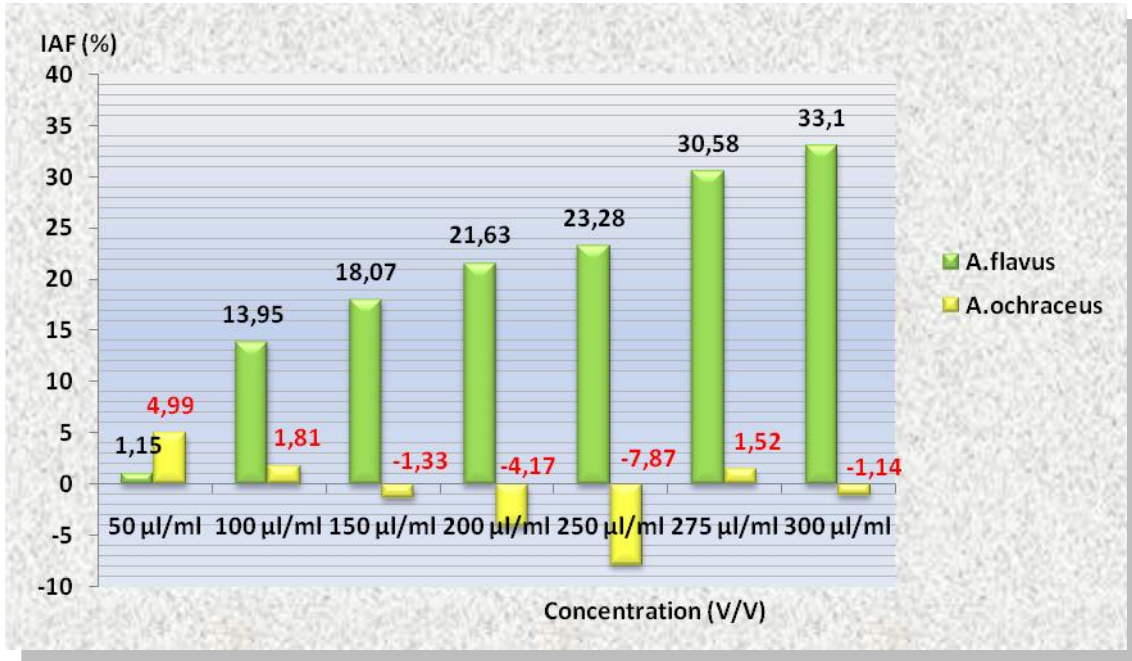


Figure 4.4 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations de l'huile de *Citrullus colocynthis* L. sur *A.flavus* et *A.ochraceus* sur milieu solide.

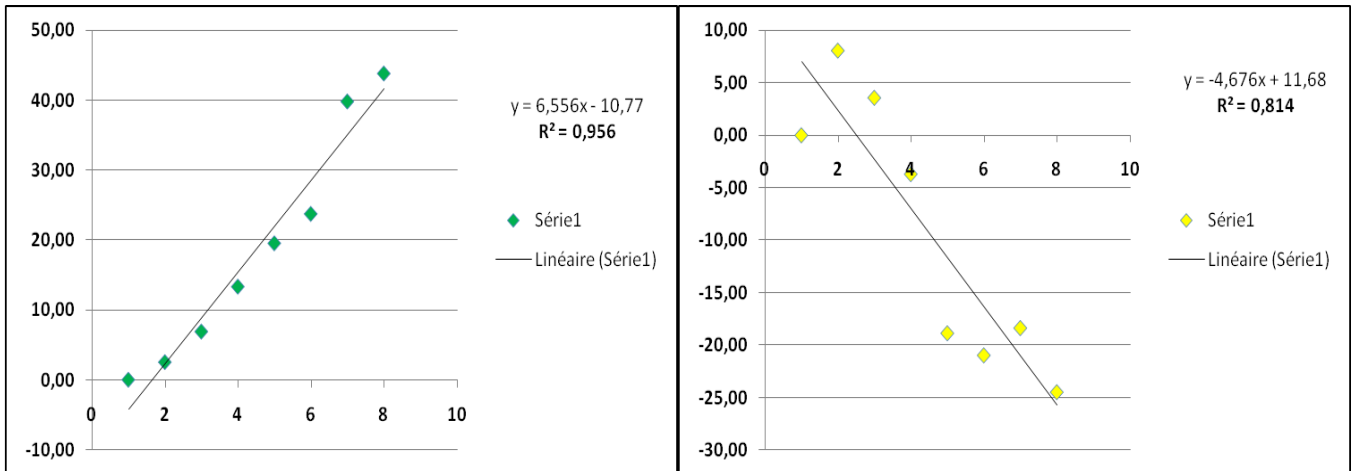
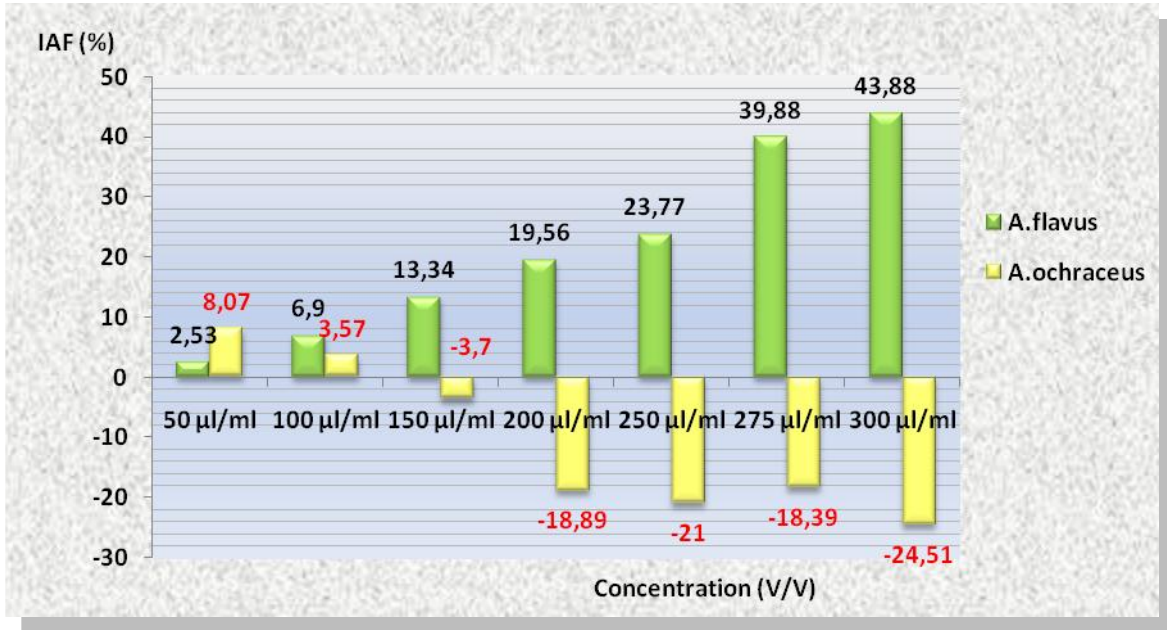


Figure 4.5 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations de l'huile de *Linum usitatissimum* sur *A.flavus* et *A.ochraceus* sur milieu solide.

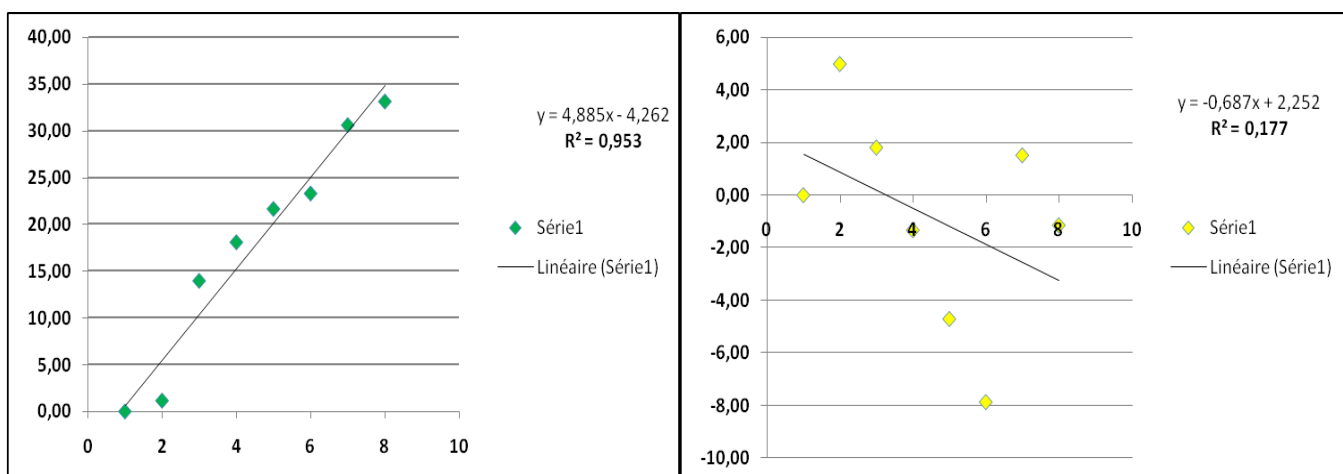
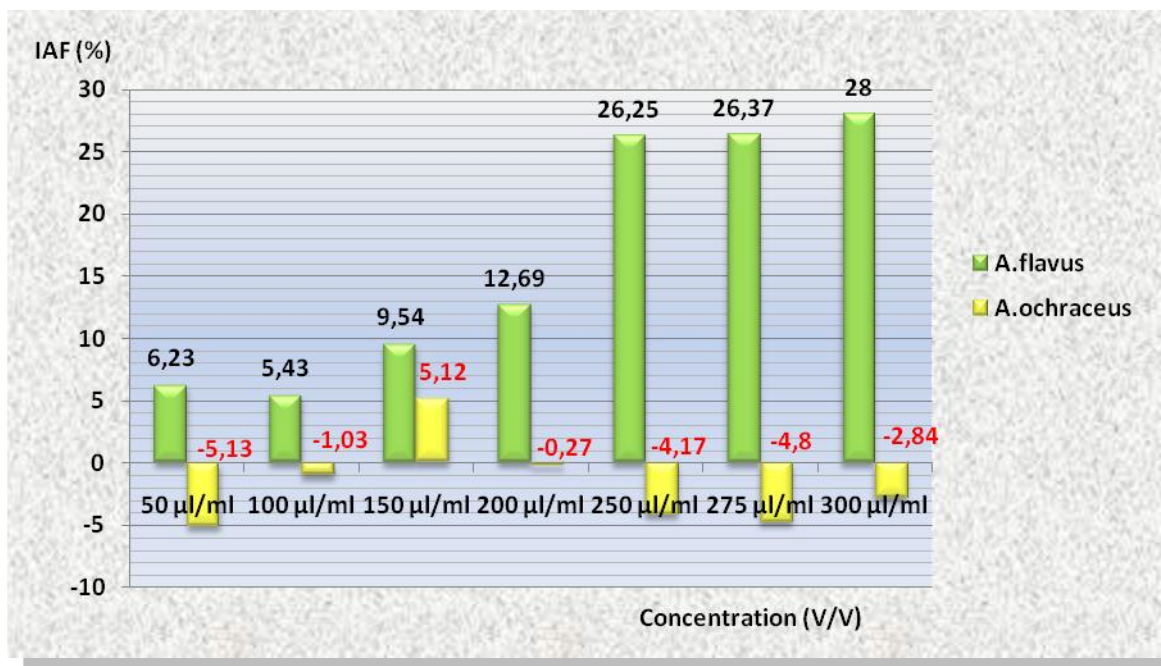


Figure 4.6 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations de l'huile de *Nigella sativa* sur *A.flavus* et *A.ochraceus* sur milieu solide.

4.5.1.2 Effet antifongique des huiles (Remmal et al., 1993)

a. Effet antifongique de l'huile de *Citrullus colocynthis* L.

L'analyse des valeurs moyennes des indices antifongiques calculées à partir des différents diamètres de la croissance radiale des deux souches fongiques sous l'effet des différentes concentrations de l'huile de *Citrullus colocynthis* regroupés sur la figure 4.7 montre que l'huile extraite des graines de *Citrullus colocynthis* à exercée un effet inhibiteur très marqué sur la souche *A.flavus* testée presque sur toutes les concentrations étudiées. L'effet optimal à été enregistré à la concentration [1/500] durant le 5eme jour d'incubation $IAF [1/500] = 40.63 [DT=7.4 \text{ cm} - D (1/500) = 3.80\text{cm}]$.

L'huile de *Citrullus colocynthis* à été Presque sans effets sur l'*A.ochraceus*, notons que sur Presque la totalité des concentrations etudiées une accélération de la croissance radiale à été remarquée, exception faite pour la concentration [1/100] ou un retard très faible a été preelvé $IAF [1/100] = 7.59$

b. Effet antifongique de l'huile de *Linm usitatisimum* L.

La figure 4.8 affichant les valeurs des moyennes des diamètres de la croissance radiale de la souche *Aspergillus* sur le milieu PDA acidifié additionné des différentes concentrations de l'huile de *L.usitatisimum* L., révèle que cette huile à exercée le meilleur effet antifongique de toutes les huiles testées dans ce travail. Cet effet à été notifié pour les deux souches testées.

Le retard de la croissance fongique à été constaté pour *A.flavus* sur toutes les concentrations de l'huile de Lin ajoutée. L'effet antifongique à été détecté généralement durant le cinquième jour d'incubation, Les indices antifongiques prélevés ont été les plus forts sur toutes les concentrations avec un optimum prélevé à la concentration [1/2000]. $IAF [1/2000]=47.01$. L'activité antifongique de l'huile de *L.usitatisimum* L. sur *A.ochraceus* a été moins importante que celle sur *A.flavus*. En effet une fluctuation de l'indice antifongique est nettement visible sur la $[IAF [1/2000]=38.98 - IAF [1/1000]=24.46 - IAF [1/100]=19$.

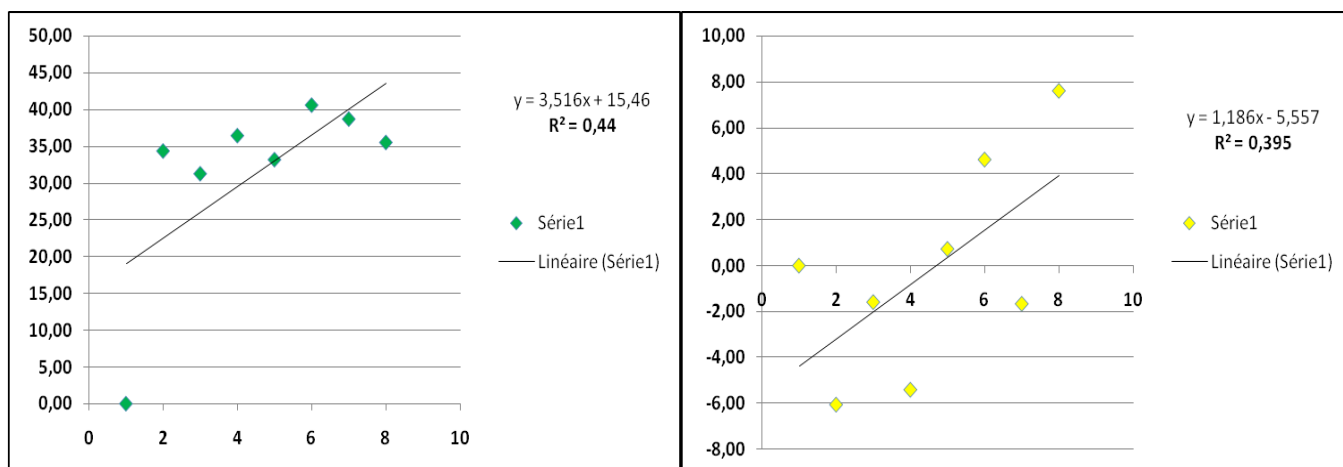
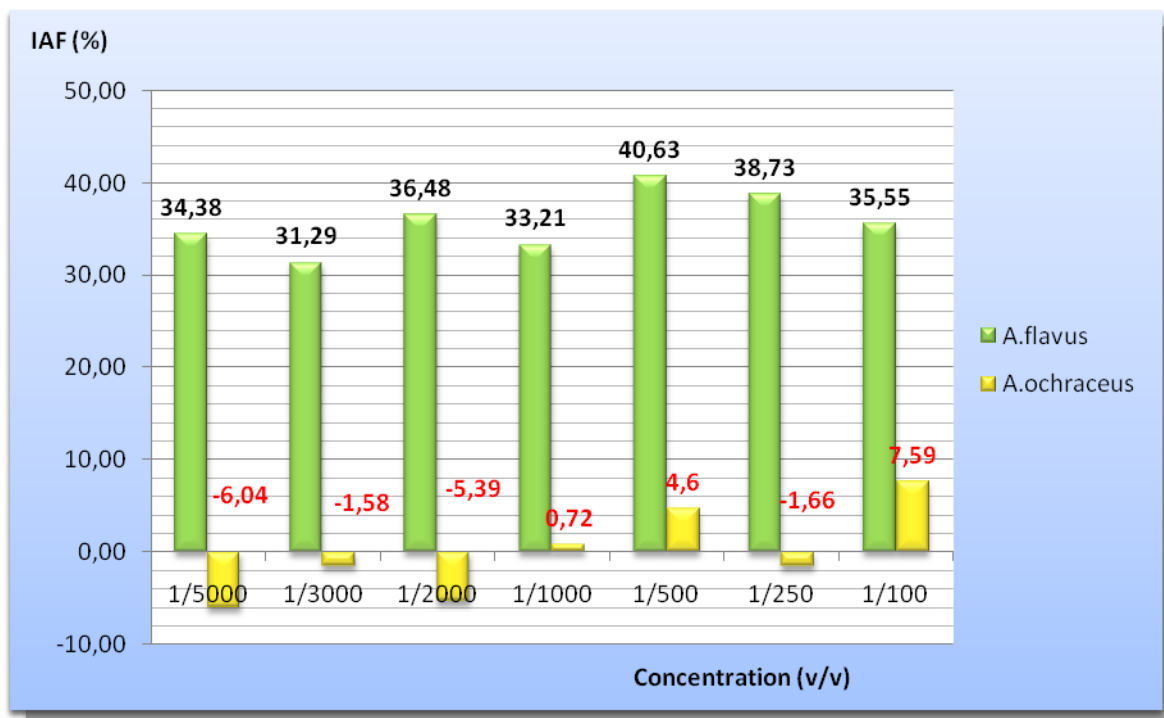


Figure 4.7 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations de l'huile de *Citrullus colocynthis* sur *A. flavus* et *A.ochraceus* sur milieu solide.

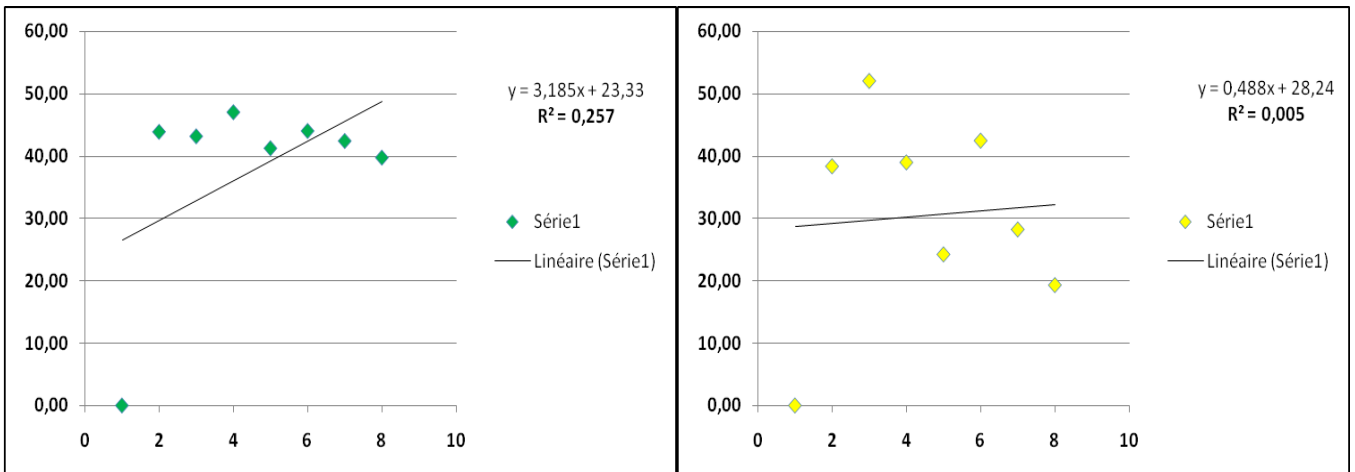
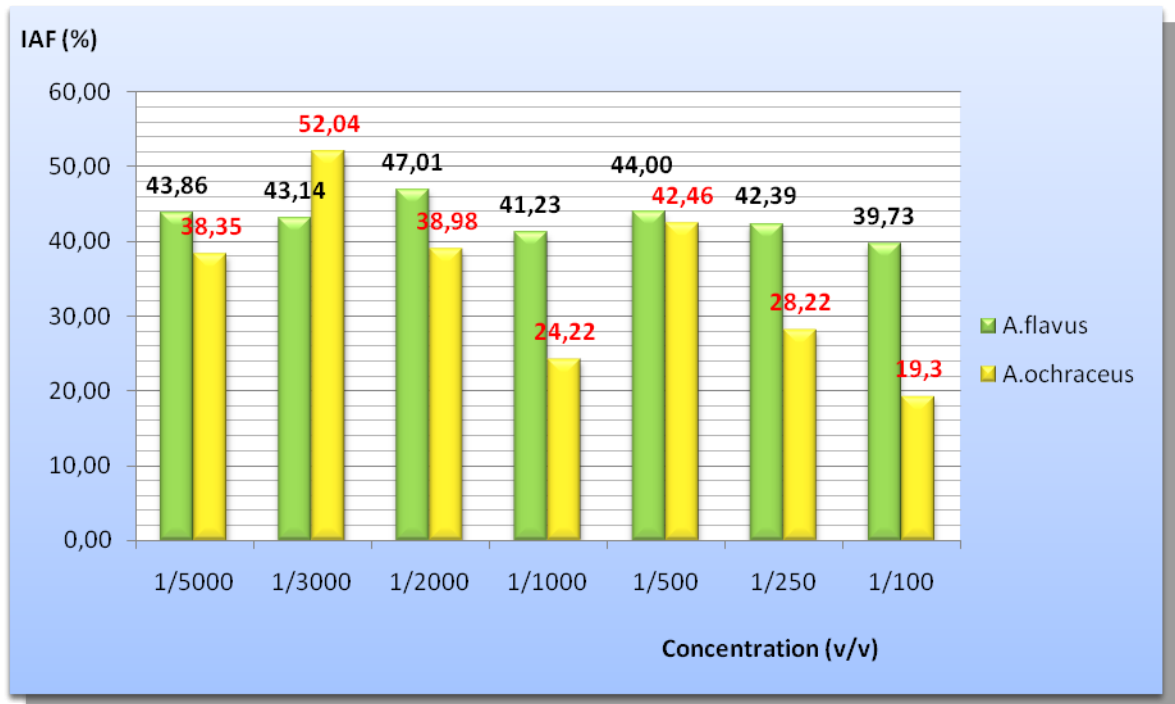


Figure 4.8 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations de l'huile de *Linum usitatissimum* sur *A.flavus* et *A.ochraceus* sur milieu solide.

c. Effet antifongique de l'huile de *Nigella sativa* L.

Le même constat est à porté sur l'effet de l'huile de *Nigella sativa* sur les souches d'*Aspergillus*. En effet la croissance radiale de cette souche a été retardée sur les différentes concentrations de l'huile de *Nigella sativa* ajoutées au milieu de culture figure 4.9, ce retard à été généralement plus marqué sur la souche *A.flavus*, cet effet est constaté lors du cinquième jour d'incubation.

Il est à noter par ailleurs que ce retard à été moins important que celui constaté pour les huiles précédentes. L'effet antifongique à été plus prononcé sur la souche *A.flavus* surtout au cinquième jour d'incubation et à la concentration [1/2000] ou l'on a prélevé le meilleur indice antifongique $IAF [1/2000] = 30.47$.

La souche *A.ochraceus* a été moins sensible à l'huile de nigelle, en effet l'ordre de grandeur des indices antifongique prélevé s'est échelonné entre [14.11 –23.97] avec un optimum constaté à la concentration [1/500] $IAF [1/500] = 23.97$.

4.5.1.3 Effets antifongique synergique des huiles

L'essai de l'évaluation de l'effet antifongique par action synergique réalisée par différentes formules combinant les huiles, à montré un effet plus au moins efficace de ces huiles. En effet l'association des huiles sous les combinaisons (HC/HL, HL/HN, HC/HN et HC/HL/HN) à induit un retard de croissance de la souche fongique, ce retard a été perçu sur les différentes concentrations des combinaisons de ces huiles. Il est par ailleurs important de souligner que l'effet synergique des huiles sous les différentes formules à été le plus marqué sur la souche *Aspergillus flavus*. Cet effet a été beaucoup plus prononcé durant le cinquième jour d'incubation.

a. Effet synergique HC/HL

La lecture sommaire de la figure 4.10 affichant les résultats des indices antifongiques moyens de l'effet combinant l'huile de *Citrullus colocynthis* et *Linum usitatisimum*, montre que la combinaison de ces deux huiles a exercée un effet antifongique synergique exclusive sur la souche *A.flavus*. Cet effet a été visible sur presque toutes les concentrations mais à été très marquée sur les concentrations [1/500, 1/250 et 1/100] avec un indice antifongique optimal à [1/250] $IAF=29.66$. Par ailleurs il est à signaler que la combinaison de ces deux huiles a été sans effets sur l'*A.ochraceus*

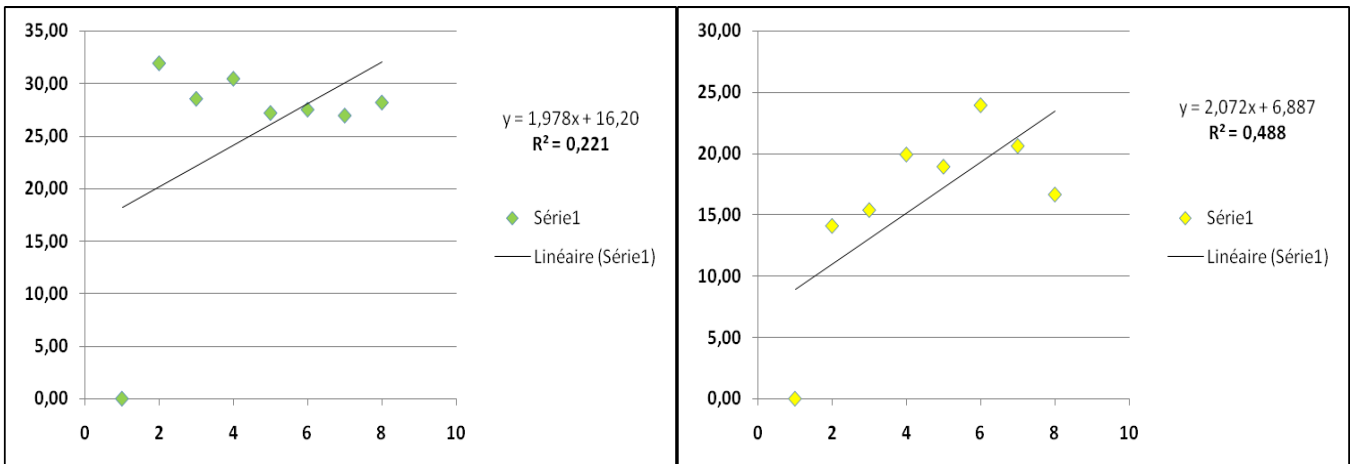
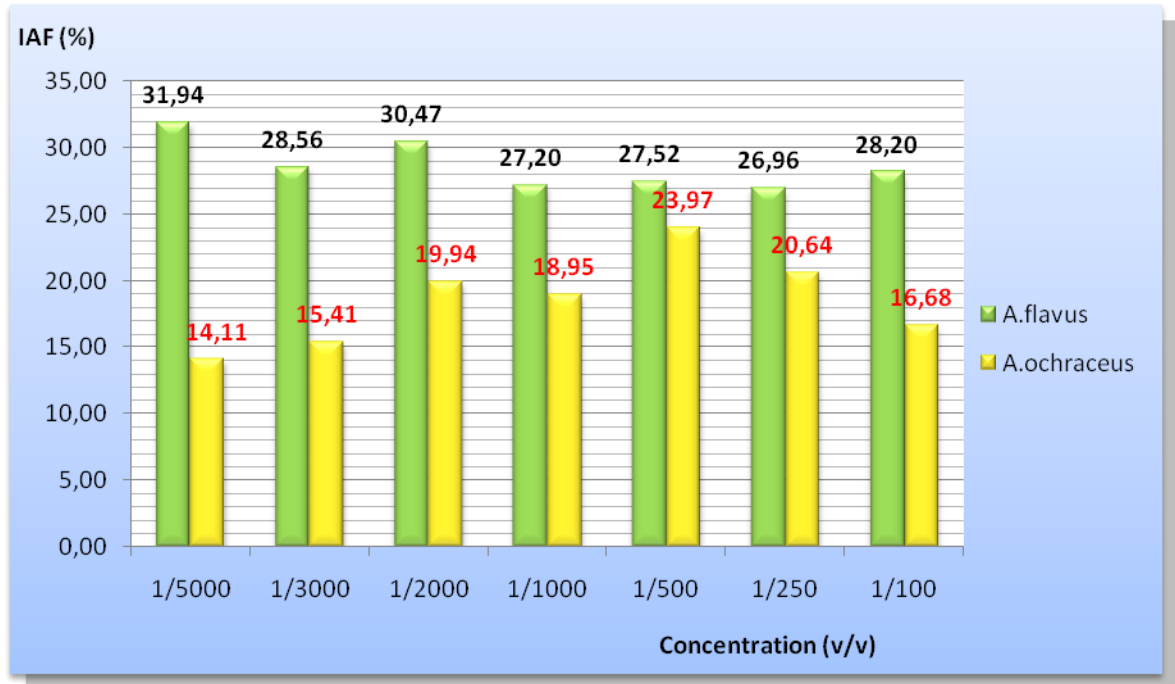


Figure 4.9 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations de l'huile de *Nigella sativa* sur *A.flavus* et *A.ochraceus* sur milieu solide.

b. Effet synergique HC/HN

L'analyse des moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations combinant l'huile de *Citrullus colocynthis* et *Nigella sativa*, révèle que la combinaison des deux huiles a exercé un effet antifongique synergique conséquent sur les deux souches *A.flavus* et *A.ochraceus* sur presque la totalité des concentrations utilisées figure 4.11. Les meilleurs indices antifongiques enregistrés ont été à la concentration [1/100] pour *A.flavus* **IAF=20.62** % et à la concentration [1/250] pour *A.ochraceus* **IAF=20.38** %.

c. Effet synergique HL/HN

L'expertise des résultats des indices moyens de l'essai de l'effet synergique antifongique de la combinaison des deux huiles (huile de *Linum usitatissimum* et huile de *Nigella sativa*) concrétisée sur la figure 4.12, montre que cette formule a été presque sans effets antifongiques sur les deux souches testées. L'hypothèse pouvant être retenue dans ce cas est que les huiles ont exercées des effets antagonistes ce qui a excité la croissance des deux souches sur quelques concentrations surtout pour ce qui est de la souche *A.ochraceus*.

d. Effet synergique HC/HL/HN

La lecture des résultats des moyennes des indices antifongiques induites par la combinaison des trois huiles étudiées (*Citrullus colocynthis*, *Linum usitatissimum* et *Nigella sativa*) consignés sur la figure 4.13, témoigne de la capacité antifongique synergique inférée par l'action de la formule combinant les huiles pour réduire la croissance radiale mycelienne des deux souches d'*Aspergillus*. Ce retard de la croissance a été plus prononcé sur la souche *A.flavus* sur toutes les concentrations.

Il est à noter que l'effet antifongique synergique de la combinaison a fluctué en ce qui concerne la souche *A.ochraceus*.

Les résultats des indices antifongiques prélevés nous permettent d'escompter l'hypothèse que ces huiles ont exercé un effet antifongique additive sur les deux souches toxigènes.

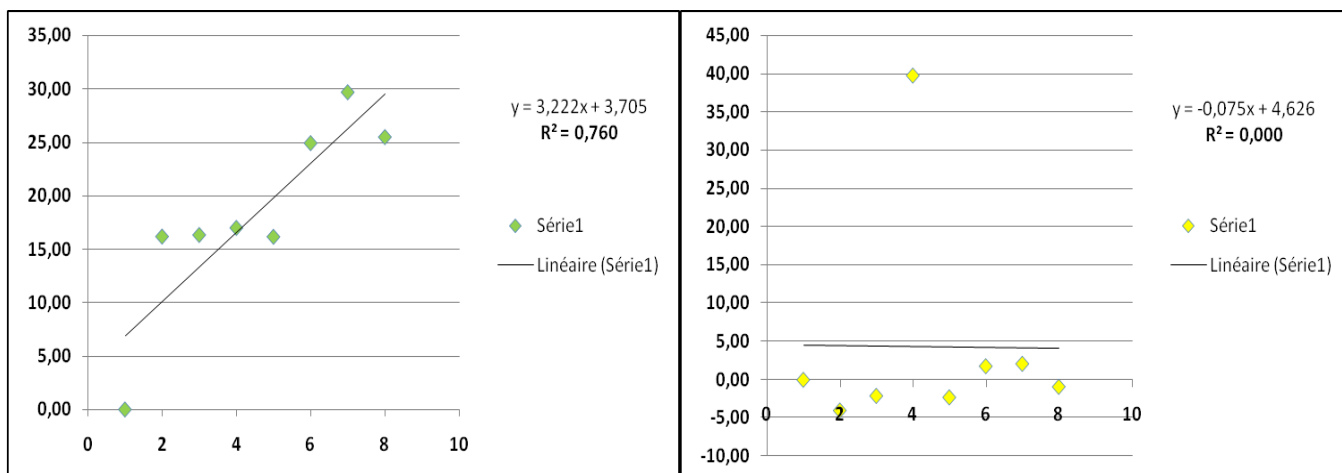
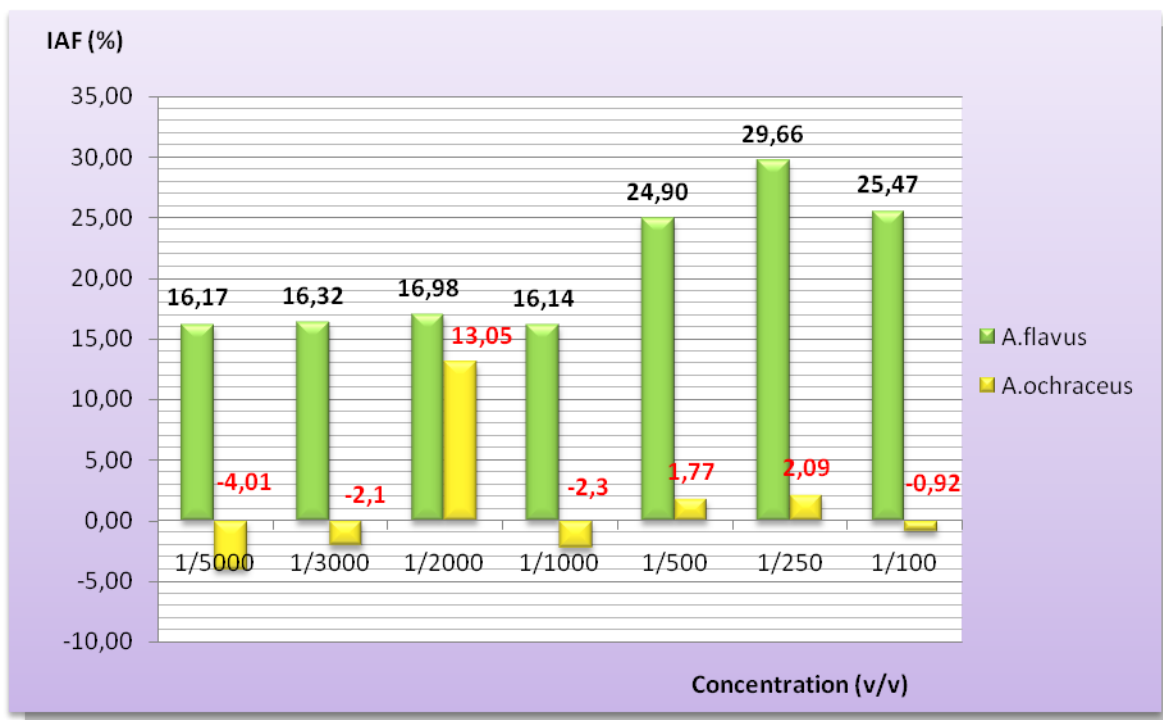


Figure 4.10 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations combinant les huiles de *Citrullus colocynthis* et *Linum usitatissimum* sur *A.flavus* et *A.ochraceus* sur milieu solide.

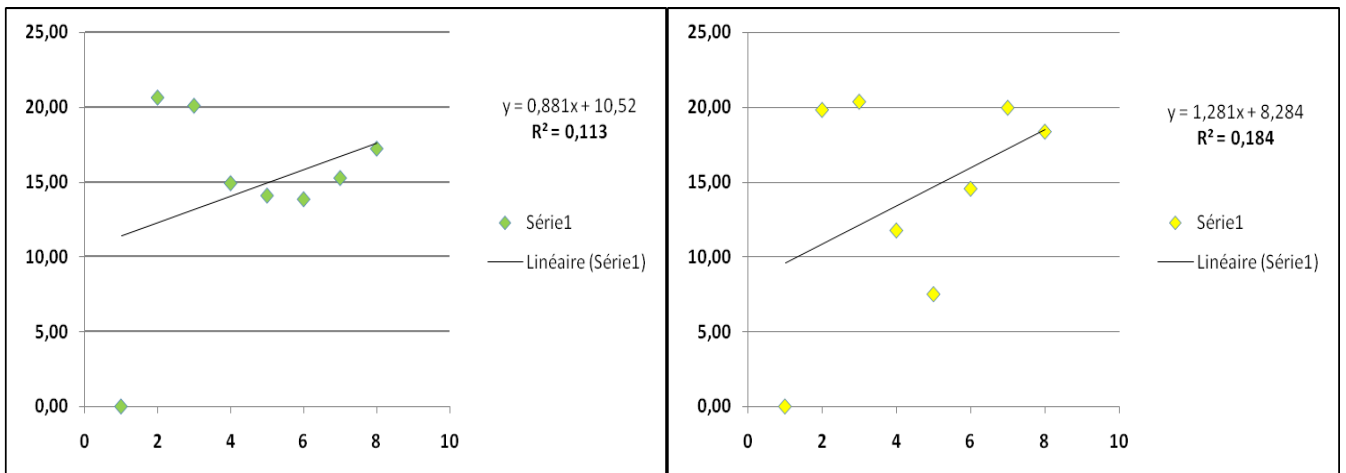
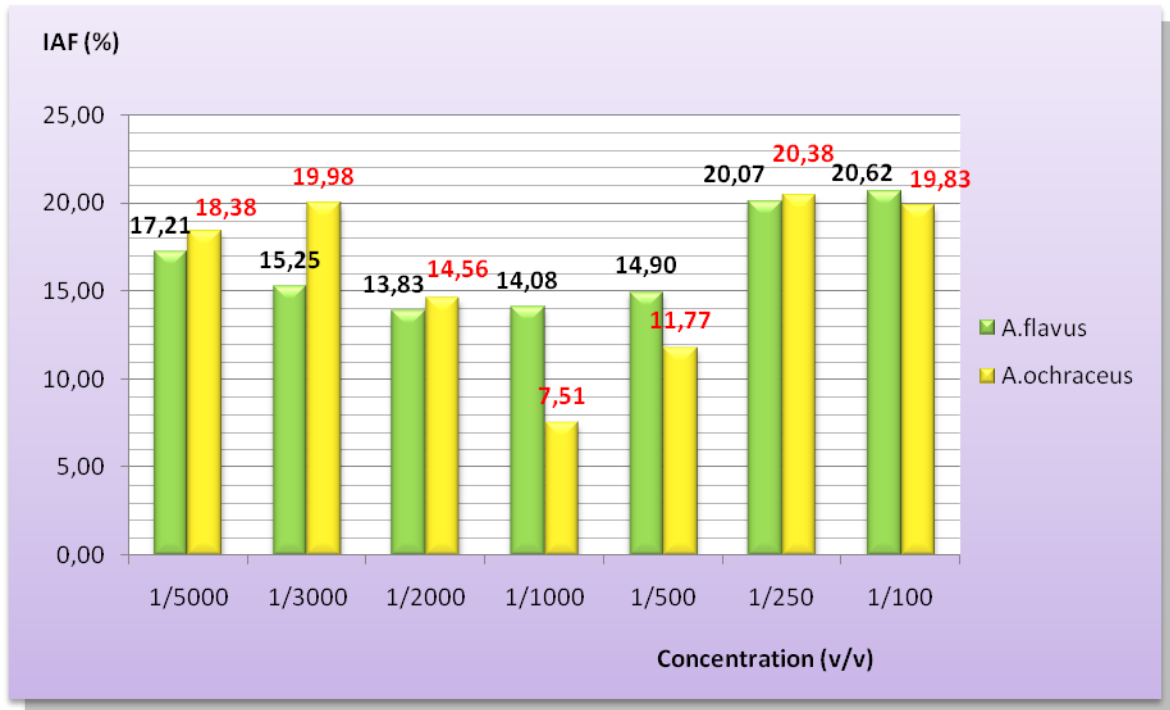


Figure 4.11 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations combinant les huiles de *Citrullus colocynthis* et *Nigella sativa* sur *A. flavus* et *A. ochraceus* sur milieu solide.

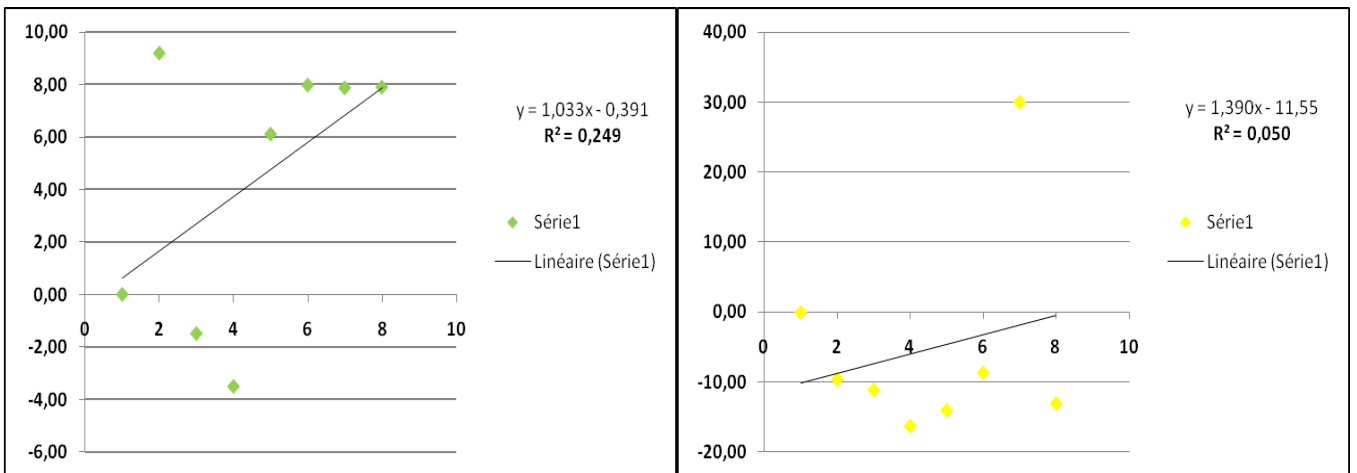
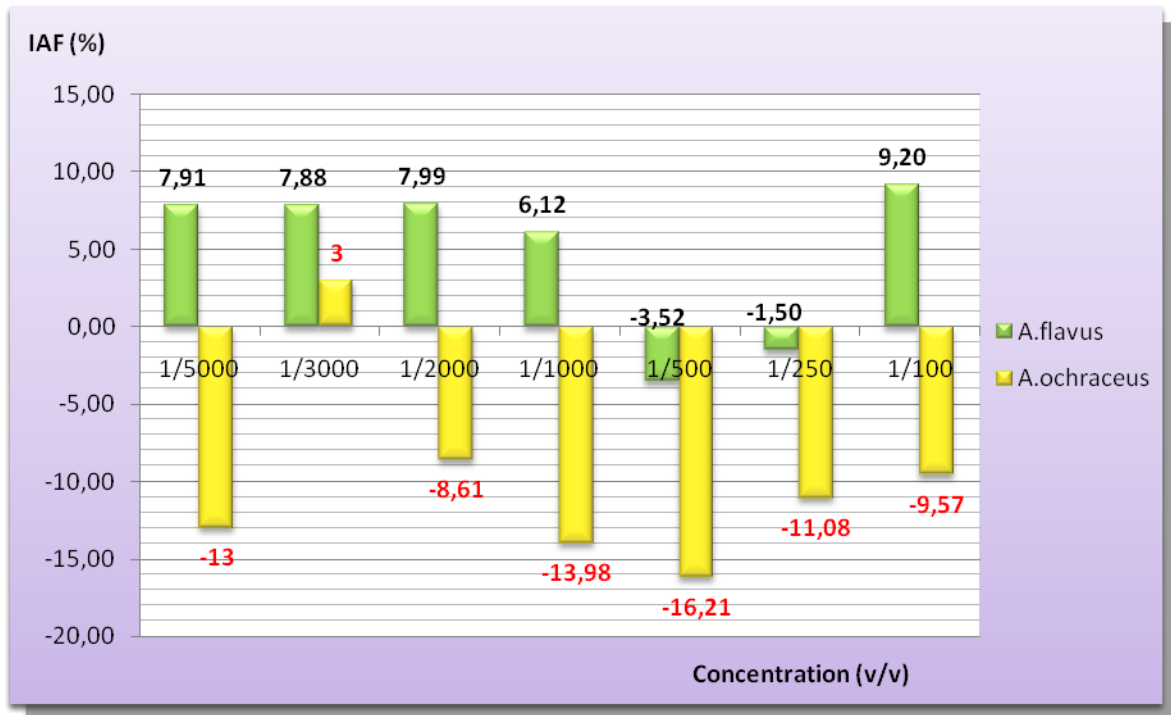


Figure 4.12 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations combinant les huiles de *Linum usitatissimum* et *Nigella sativa* sur *A.flavus* et *A.ochraceus* sur milieu solide.

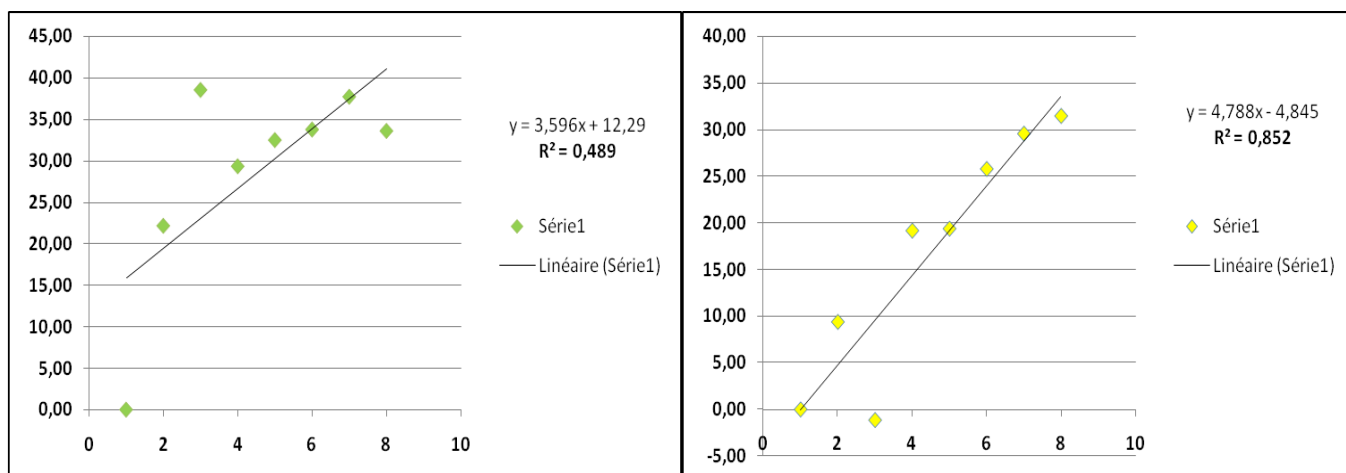
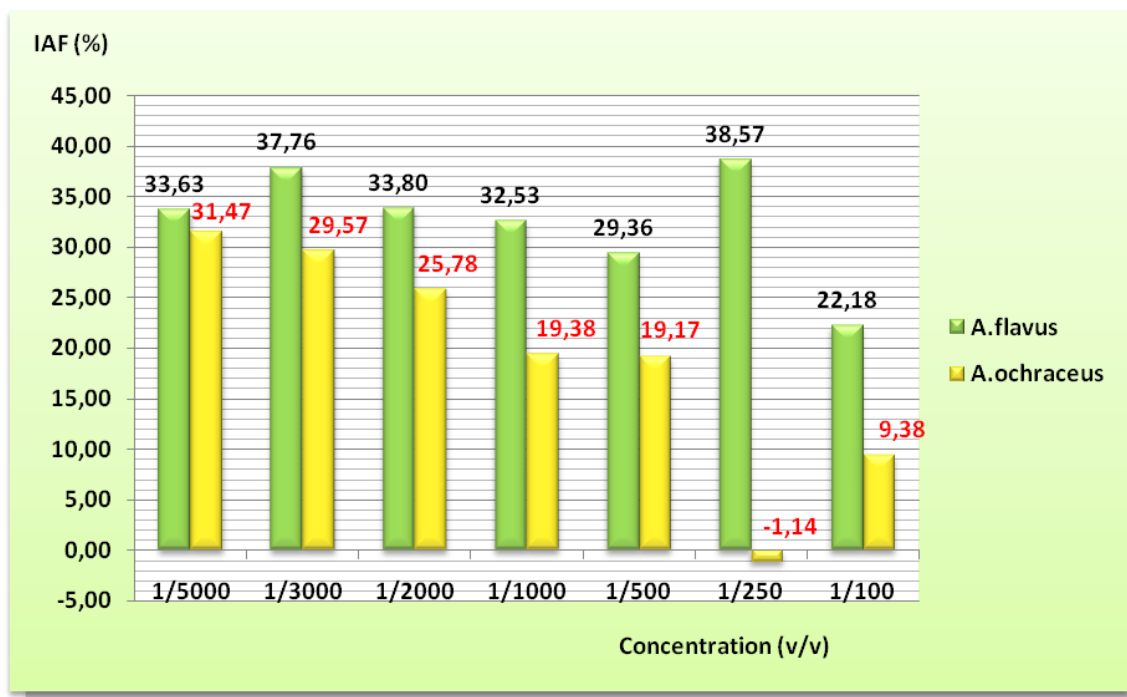


Figure 4.13 Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations combinant les huiles de *Citrullus colocynthis*, *Linum usitatissimum* et *Nigella sativa* sur *A. flavus* et *A. ochraceus* sur milieu solide

■ Exploitation statistiques (Activité antifongique sur milieu solide)

L'exploitation statistique des résultats par étude de la variance des écarts types de l'effet antifongique des différentes huiles sur les souches d'*Aspergillus* toxigènes testée, à révéler que les résultats du deuxième essai (Méthode de Remmal et al, 1993) a fourni des résultats plus significatifs.

L'analyse statistique des différents résultats de l'effet antifongique des huiles sur les souches fongiques étudiées a révélé que l'effet de ces huiles à été d'une façon générale plus significatif sur *A.flavus* qu'*A.ochraceus*. Cette même analyse à montrer que l'effet antifongique de l'huile extraite des graines de *Linum ussitatissimum* L. à été significatif sur les deux souches par rapport aux autres huiles.

L'analyse statistique des résultats de l'effet antifongique synergique des différentes formules combinant les huiles a montré que l'association des trois huiles ensemble HC/HL/HN a fourni un effet synergique antifongique significatif par rapport aux autres combinaisons. Cet effet à été très significatif sur la souche *A.flavus*. Les résultats des autres essais d'association synergique des huiles ont été peu ou pas significatifs.

4.5.1.4 Effet antifongique des esters isolés des huiles testées

La lecture des résultats de l'effet antifongique des esters méthylique extraite des différentes huiles, montre que ces fractions ont exercé un effet retardateur appréciable sur la croissance des souches d'*Aspergillus*, et ce, sur toutes les concentrations testées. Cet effet à été beaucoup plus marqué pour les fractions d'esters majoritaires que celles brutes. L'exploitation des résultats montre aussi que l'effet antifongique à été beaucoup plus prononcé sur la souche *Aspergillus flavus*. Notons que l'ordre d'efficacité décroissant de ces fractions d'esters a été : FAME's de *Linum ussitattissimum* > FAME's de *Citrillus colocynthis* > FAME's de *Nigella sativa*.

Le détail de ces résultats, révèle que l'effet antifongique de ces fractions FAME's à été détecté en général au cours du cinquième jour (5e jour) d'incubation. Les meilleurs indices antifongiques prélevés pour les fractions de l'huile de *Linum ussitattissimum* L., ont été enregistrés sur IAF 10 µL =54.19, IAF 20 µL = 53.19, IAF 50 µL = 51.69, IAF 60 µL =50.73. Les meilleurs indices enregistrés pour *A.ochraceus* ont été de l'ordre de : IAF 40 µL = 40.44, IAF 90 µL = 40.48 figure 4.14.

Les fractions d'esters FAME's isolées à partir de l'huile des graines de *Citrullus colocynthis* L.figure 4.15, ont fourni des indices antifongiques de la même grandeur que les fractions précédentes avec un degré moins. Le même constat peut être reporté, en effet la fraction FAME's isolée à partir de l'huile de coloquinte a induit un effet antifongique beaucoup plus marqué sur la souche *A.flavus* (IAF 70 µL =51.34, IAF 80 µL = 51.17, IAF 90 µL = 50.89). L'effet sur *A.ochraceus* à été plus modéré (IAF 40µL =28.37, IAF 50µL = 28.90, IAF 100 µL = 28.52).

La lecture des résultats concernant l'effet antifongique portant sur l'action de la fraction FAME's extraite à partir de l'huile de *Nigella sativa* L. figure 4.16, montre que l'effet inhibiteur de la croissance de cette fraction sur les souches fongiques toxigènes à été moins important que l'effet des deux premières fractions. Cet effet a été de l'ordre de IAF 10 µL =46.97, IAF 20 µL = 45.217, IAF 50 µL = 51.69, IAF 30 µL =45.32 pour l'*A.flavus* et IAF 40µL =24.32, IAF 50µL = 23.94, IAF 70µL = 21.30 pour le cas d'*A.ochraceus*.

L'analyse statistique des écarts types par le calcul de la variance des différents résultats obtenus montre que les résultats de l'indice antifongique sur *A.flavus* ont été très significatifs.

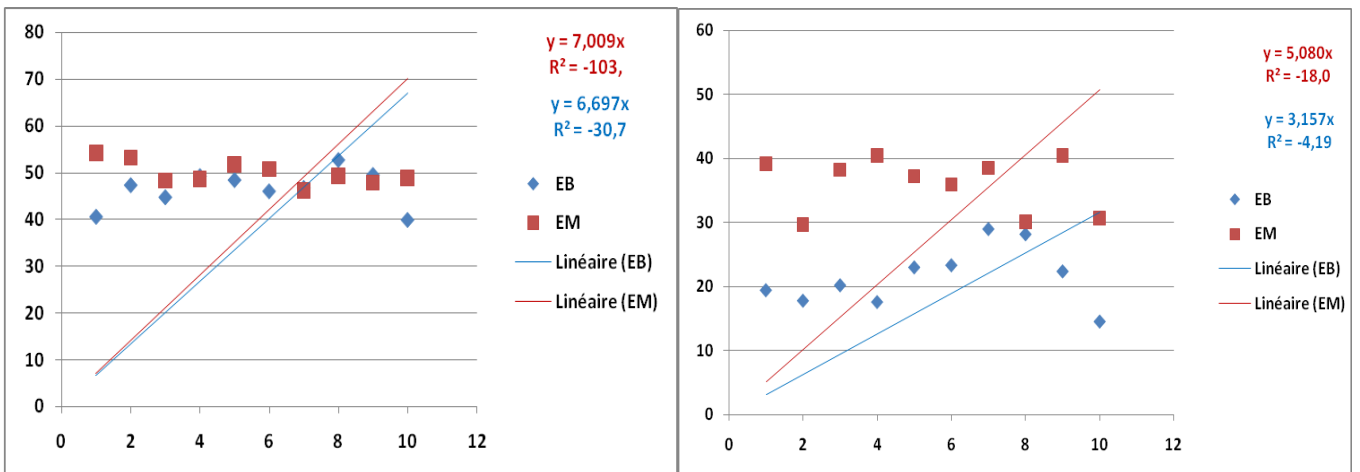
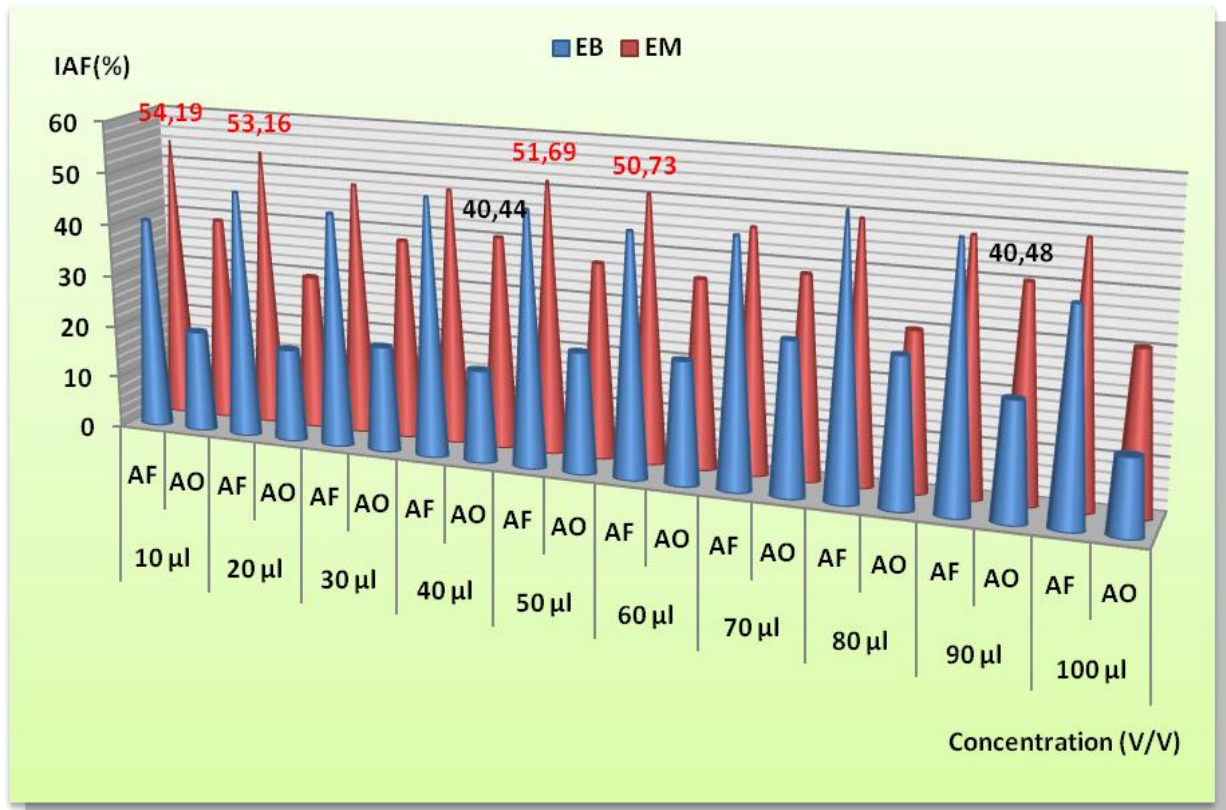


Figure 4.14 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations des esters extraits de l'huile de *Linum usitatissimum* sur *A.flavus* et *A.ochraceus* sur milieu solide.

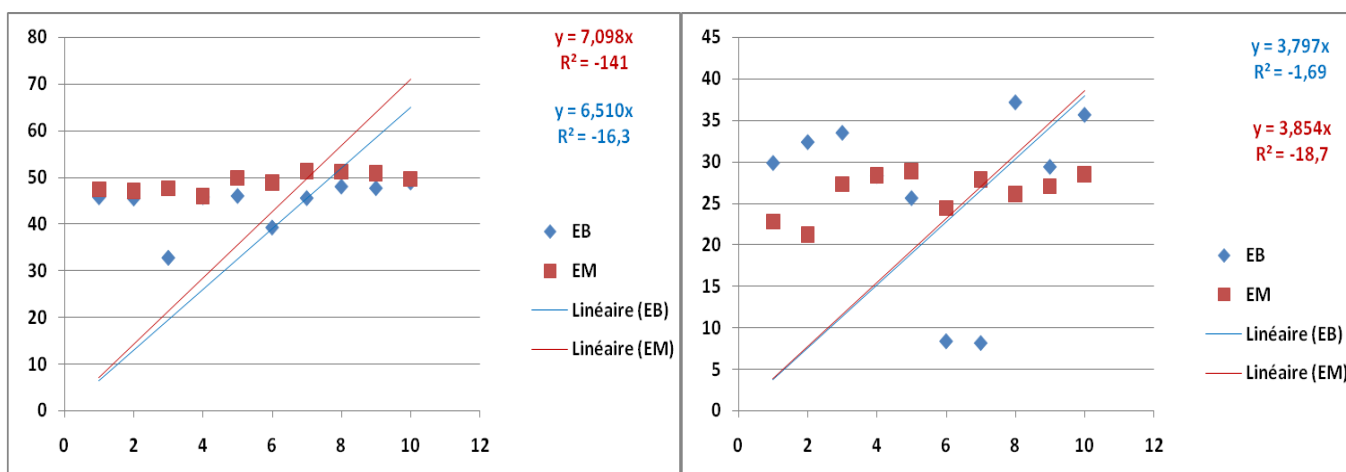
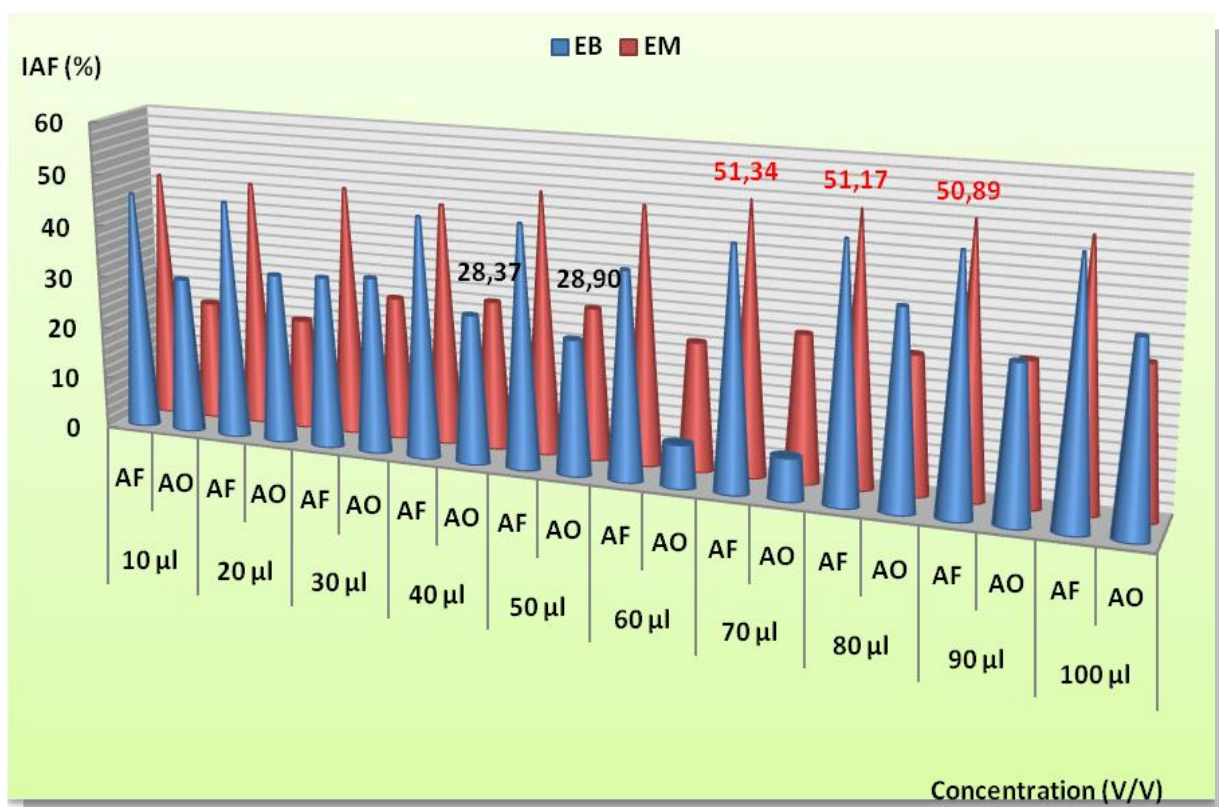


Figure 4.15 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations des esters extraits de l'huile de Citrullus colocynthis sur A.flavus et A.ochraceus sur milieu solide.

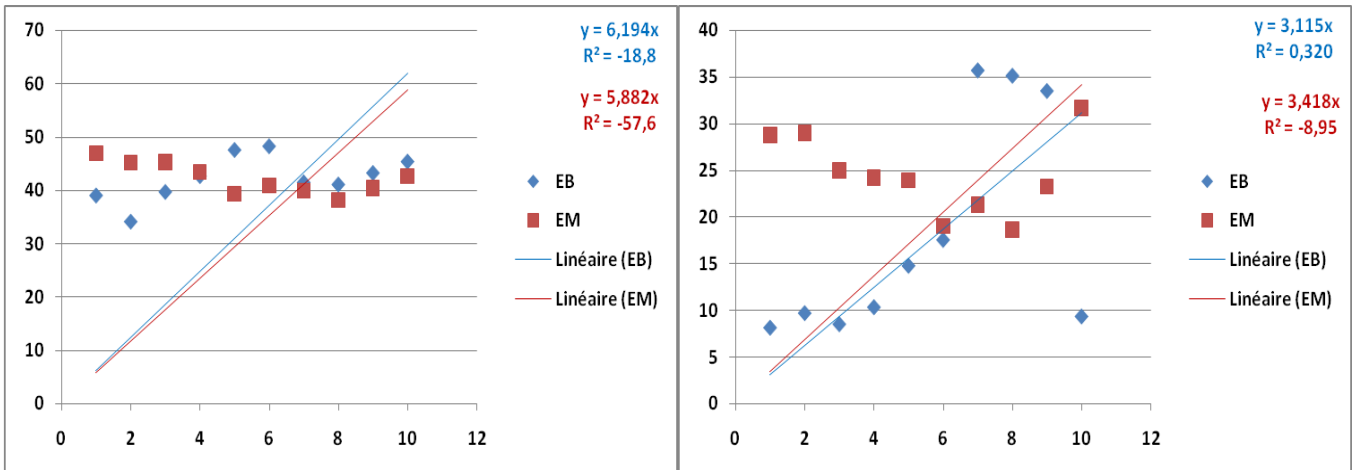
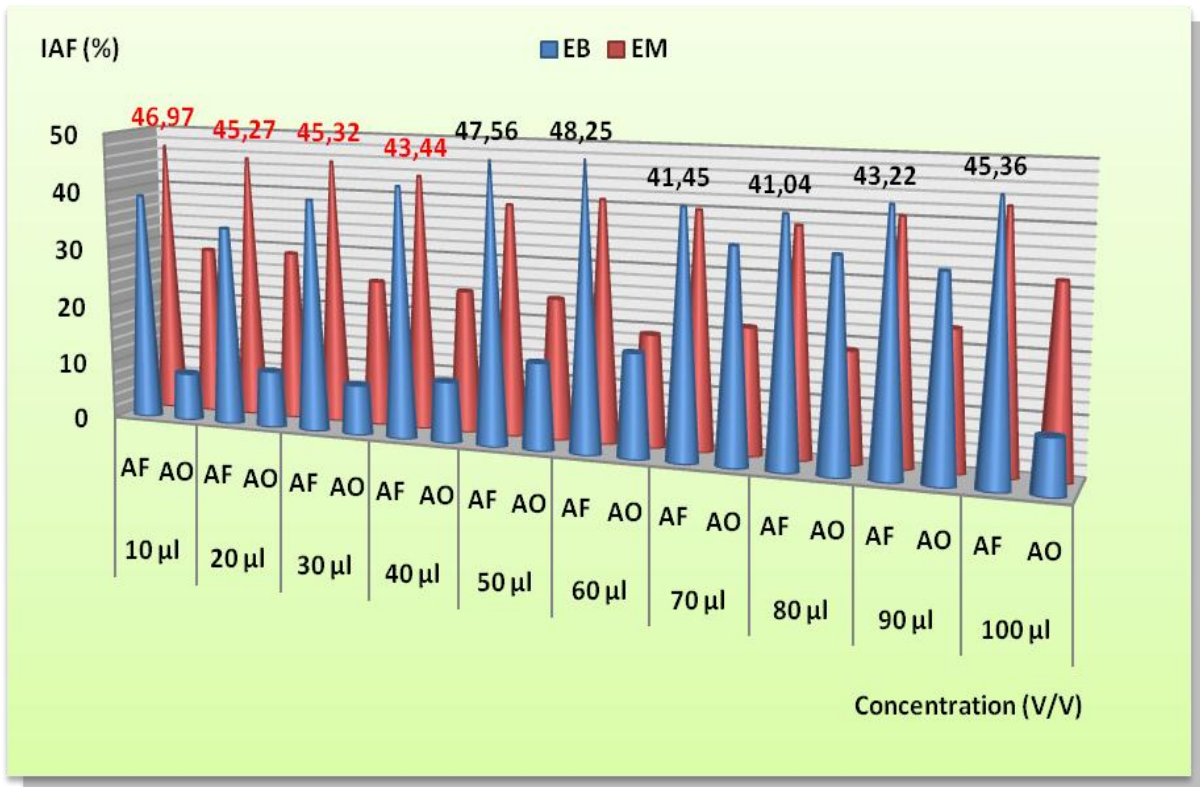


Figure 4.16 Moyennes des indices antifongique des différentes concentrations des esters extraits de l'huile de *Nigella sativa* sur *A.flavus* et *A.ochraceus* sur milieu solide.

4.5.2 Evaluation de la biomasse en milieu liquide

4.5.2.1 effets antifongiques des huiles brutes

En general, les résultats de l'essai de l'activité antifongique par l'évaluation de la biomasse sur milieu liquide n'ont pas révélés l'effet escompté. En effet les différentes huiles utilisées dans ce travail à l'état brut n'ont pas exercées un effet antifongique sur les différentes souches d'*Aspergillus* testées. Les résultats représentés sur les figures 4.17 et 4.18 montrent que les poids des biomasses récupérées après séchage et confrontation aux poids des différents poids témoins ce sont révélés pour la plupart supérieur aux poids des témoins.

L'analyse des résultats relatifs à la biomasse fongique d'*Aspergillus flavus* formée en présence des différentes concentrations d'huile de *Linum usitatissimum* L. affichés dans la figure 4.17 montre que les poids des biomasses sont plus ou moins supérieurs par rapport aux témoins (0.2584g), ces poids varient entre 0.2190g et 1.1530g.

Notons que les poids des biomasses prélevés à la concentration 20, 40 et 60 µl/ml ont été proportionnels à la concentration d'huile ajoutée dans le milieu. Par contre les biomasses formées aux autres concentrations ont été inversement proportionnelles.

Le même constat est dressé pour l'effet de l'huile de la Coloquinte sur les différentes concentrations.

La lecture des résultats de la même figure donnant les moyennes des poids des biomasses formées sous l'action des différentes concentrations d'huile de nigelle montre une nette fluctuation des poids par rapport à la concentration d'huile ajoutée.

A la concentration 20, 40, et 60 µl/ml les poids prélevés sont presque constant (0,6400 g), puis diminuent aux concentrations 80 et 100µl/ml (0,5047 g - 0,3390 g). Une augmentation est perçue aux concentrations 110 et 120 µl/ml (0,6000 g).

Il faut noter que la souche *Aspergillus ochraceus* s'est révélée plus résistante aux différentes huiles ajoutées au milieu de culture. En effet, les résultats des biomasses formées montrent une augmentation très importante des poids.

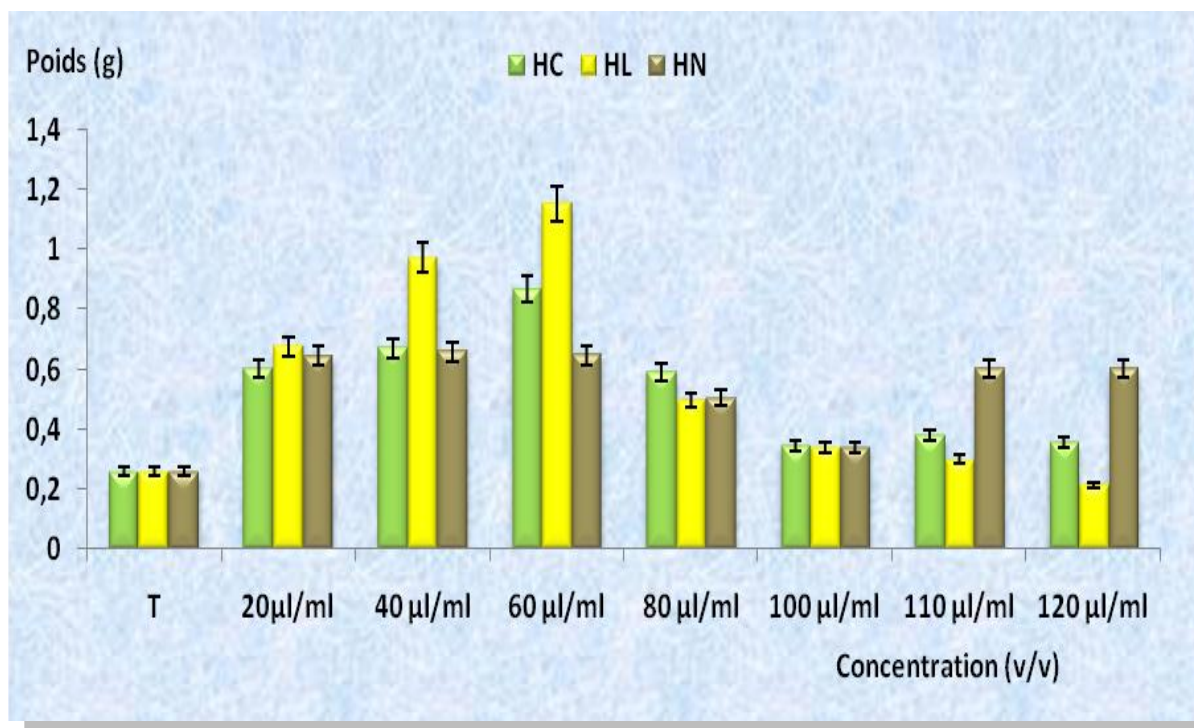


Figure 4.17 Moyennes des poids des biomasses d'*Aspergillus flavus* formées sous les différentes concentrations des huiles extraits de *Citrullus colocynthis* - *Linum usitatisimum* et *Nigella sativa* sur milieu liquide.

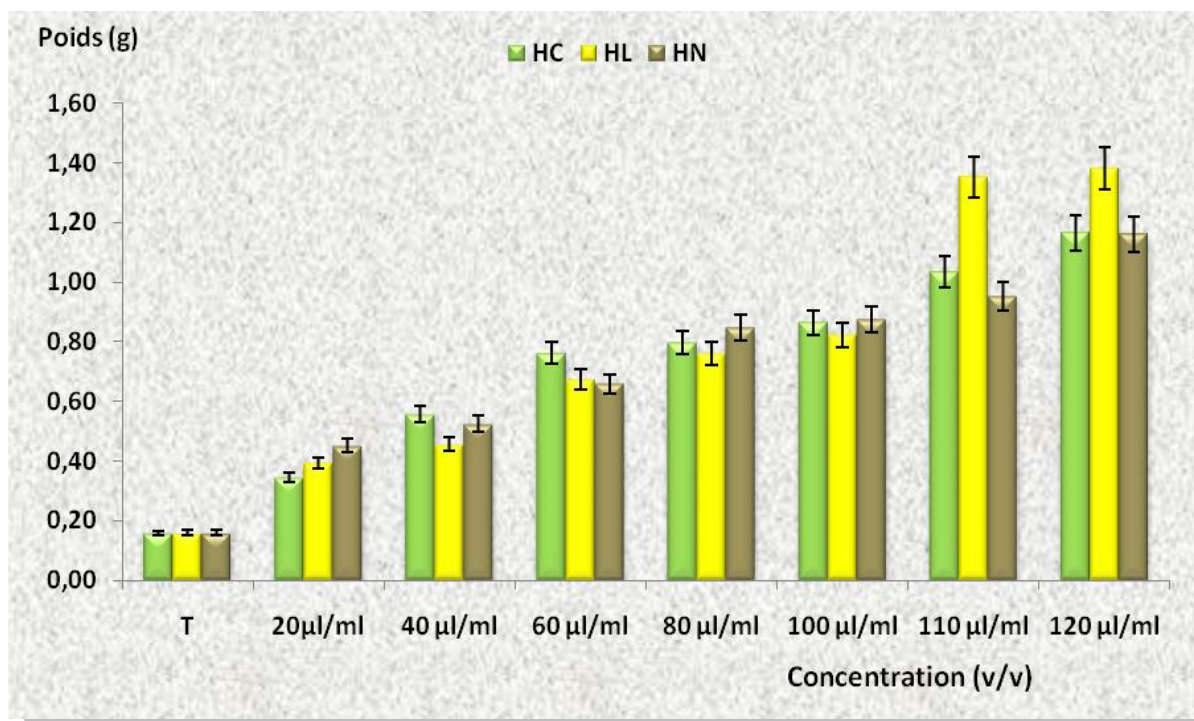


Figure 4.18 Moyennes des poids des biomasses d'*Aspergillus ochraceus* formées sous les différentes concentrations des huiles extraits de *Citrullus colocynthis* - *Linum usitatisimum* et *Nigella sativa* sur milieu liquide.

4.5.2.2 effets antifongiques des esters

Les résultats obtenus par cette évaluation, représentés sur les supports graphiques des figures 4.19, 4.20, 4.21 et 4.22, montrent en général un effet antifongique très modérée pour les différentes fractions d'esters étudiées.

En effet, la lecture des différentes figures laisse voir un retard de croissance perçue par une différence de poids des biomasses récoltées sur les différentes concentrations d'huiles étudiées par rapport aux poids des biomasses des témoins ; Notons que cette différence ne reflète pas l'effet antifongique escompté et ce par comparaison de l'effet antifongique de ces mêmes fractions sur le milieu solide.

L'analyse des résultats des différentes figures montre que les fractions d'esters majoritaires ont fournies un effet retardateur plus au moins prononcé que les fractions brutes.

La lecture des résultats des figures de l'effet antifongique des esters sur les souches d'*Aspergillus*, montre qu'*Aspergillus flavus* a été plus sensible vis-à-vis des fractions étudiées. En parallèle à ce constat, les fractions d'esters extraites de l'huile de *Linum usitatissimum* L. ont révélées un effet antifongique plus important que les autres fractions étudiées. Cet effet a été plus prononcé sur la souche *A.flavus* (IAF_{2.6µl/ml}=13.87, IAF_{3.3µl/ml}=14.84, IAF_{4µl/ml}=13.55, IAF_{5.3µl/ml}=13.68). Pour *A.ochraceus* les indices antifongiques enregistrés ont été moins importants (IAF_{4.6µl/ml}=11.45, IAF_{6µl/ml}=11.78, IAF_{6.6µl/ml}=11.56).

Par ailleurs, la lecture des résultats de l'activité antifongique des fractions d'esters brutes ou majoritaires (figures 4.21 et 4.22), extraites des différentes huiles végétales étudiées, montre que l'effet antifongique a été proportionnel à l'augmentation de la concentration d'ester ajoutée au milieu de culture. Ce constat a été particulièrement observé pour les fractions d'esters extraites de l'huile de *Linum usitatissimum* L. (IAF_{2µl/ml}=8.35, IAF_{2.6µl/ml}=8.78, IAF_{4µl/ml}=9.47, IAF_{4.6µl/ml}=10.6, IAF_{5.3µl/ml}=11.45, IAF_{6µl/ml}=11.78). Notons que les fractions d'esters majoritaires extraites de l'huile de *Citrullus colocynthis* L. ont exercés un effet antifongique modéré sur *A.ochraceus* différent de celui exercé sur *A.flavus*.

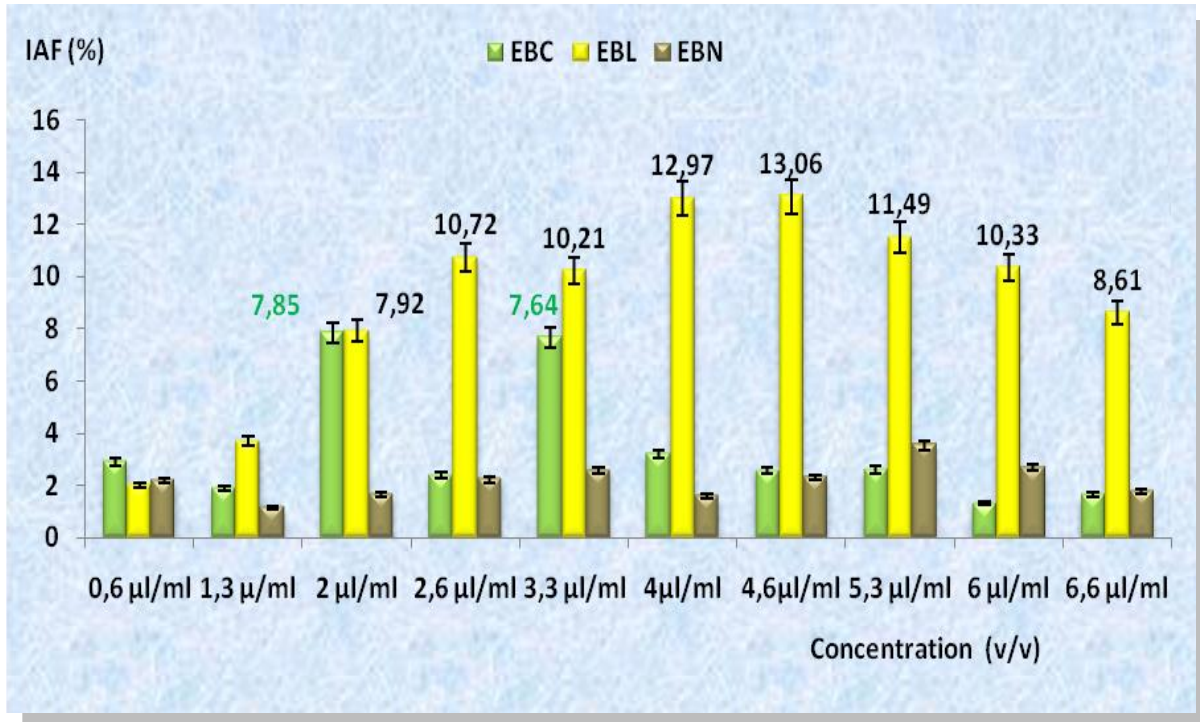


Figure 4.19 Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters bruts extraits des huiles de *Citrullus colocynthis* - *Linum usitatissimum* et *Nigella sativa* sur *Aspergillus flavus* sur milieu liquide.

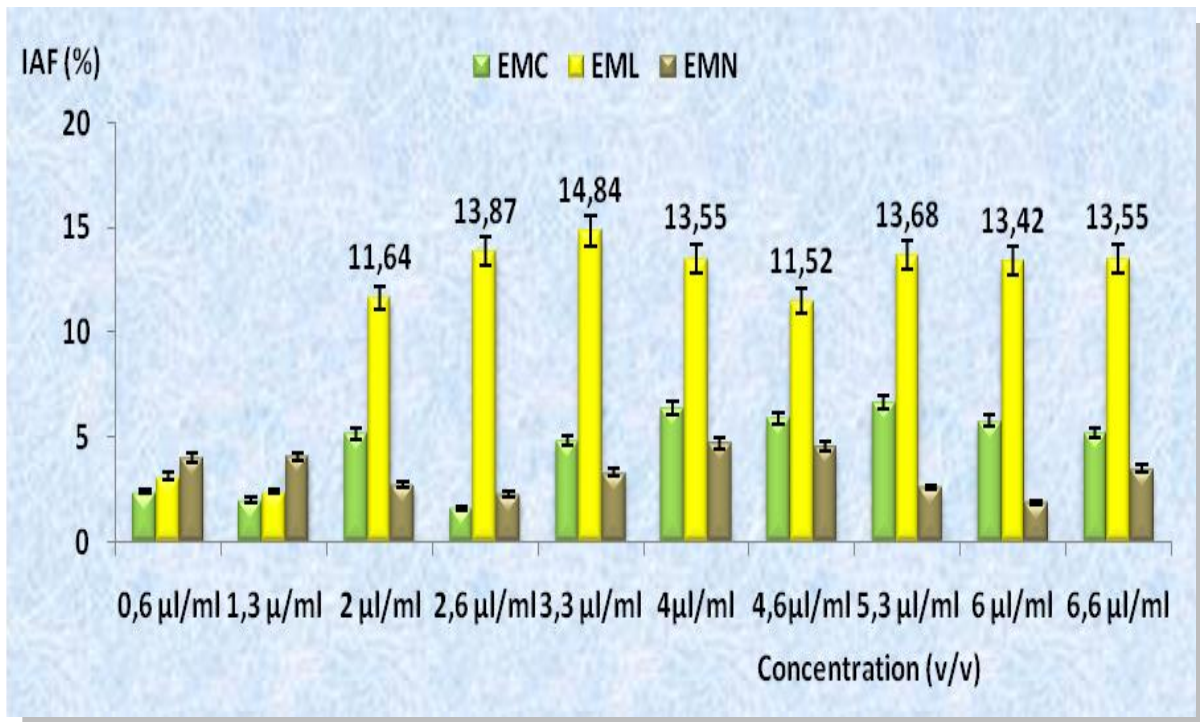


Figure 4.20 Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters majoritaires extraits des huiles de *Citrullus colocynthis* - *Linum usitatissimum* et *Nigella sativa* sur *Aspergillus flavus* sur milieu liquide.

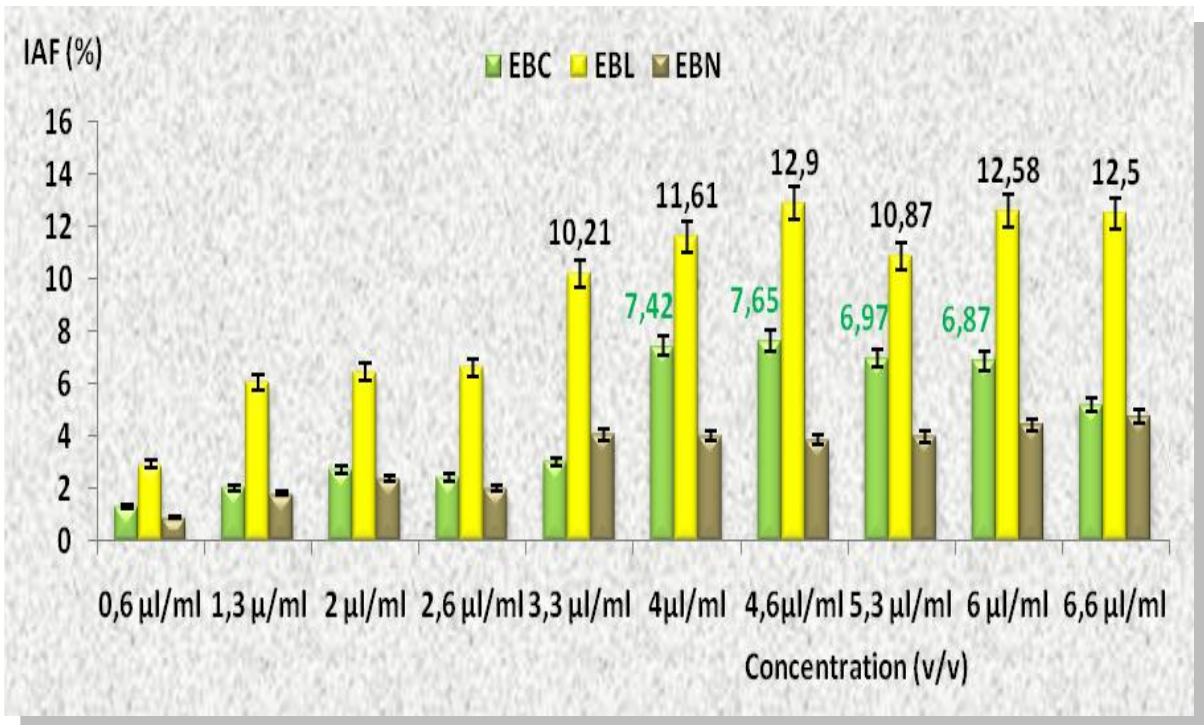


Figure 4.21 Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters bruts extraits des huiles de *Citrullus colocynthis* - *Linum usitatissimum* et *Nigella sativa* sur *Aspergillus ochraceus* sur milieu liquide.

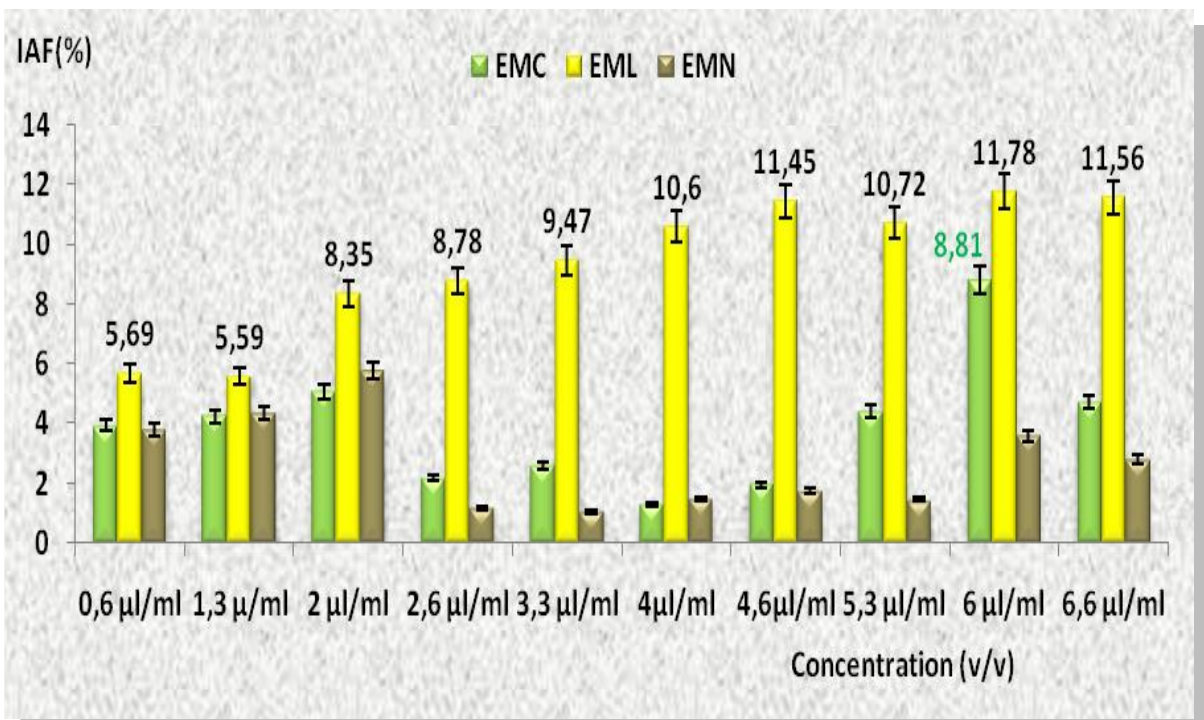


Figure 4.22 Moyennes des indices antifongiques des différentes concentrations des esters majoritaires extraits des huiles de *Citrullus colocynthis* - *Linum usitatissimum* et *Nigella sativa* sur *Aspergillus ochraceus* sur milieu liquide.

4.5 Discussion

De nombreux xénobiotiques d'origine naturelle ou industrielle sont susceptibles d'être retrouvés dans l'alimentation destinée à des populations humaines et animales. L'existence de ces contaminations a de multiples conséquences pouvant affecter l'homme et l'animal allant d'intoxications légères, en passant par des manifestations physiopathologiques graves, jusqu'à l'issue fatale: les tumeurs cancéreuses. En effet selon **MEBITIL (2006)**, un nombre important de cancers humains sont imputables à des facteurs environnementaux et plus particulièrement à des facteurs alimentaires.

La contamination fongique compte parmi les principales causes de détérioration des denrées alimentaires, surtout après la découverte des mycotoxines produites par ces micro-organismes qui n'a fait qu'accroître les soucis des agriculteurs, des industriels, des scientifiques et du simple consommateur (**TAHANI & EL AMRANI, 2008**).

Véritables adversaires subtils, les moisissures constituent un inoculum tranquille, invisible, dormant et pourtant susceptible de produire des effets très dommageables, voire catastrophiques lorsque les conditions deviennent favorables. Adversaires plus subtils encore lorsque les dommages visibles aux matières ont été gommés par des procédés de transformation, faisant disparaître les signes perceptibles de l'activité des moisissures sans éliminer pour autant les principes toxiques, souvent très stables, qui ont pu être formés auparavant et empêchant du même coup toute recherche de corrélation entre présence de moisissures et risque mycotoxique (**BEJAOUI, 2005**). En effet, face à ces risques alimentaires et à l'émergence d'un sentiment sain dont la qualité et la sécurité alimentaire sont garanties (**CANADAS, 2006**).

La problématique des mycotoxines est non seulement mystérieuse mais aussi universelle du fait de ses répercussions sur la santé publique, l'agriculture et les sciences économiques (**NGUYEN, 2007**). Notons qu'il est difficile parfois même impossible d'éliminer ces mycotoxines. La prévention constitue sans aucun doute la meilleure façon de réduire la contamination des produits d'alimentation humaine et animale par les champignons et leurs toxines (**PINERIO et al., 2005 ; CARLES & CORTÉS, 2004**). La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes purement naturelles est la préoccupation capitale de la plupart des scientifiques et des chercheurs (**BENZEGOUTTA, 2005**).

La recherche de nouvelles substances d'origine naturelle à action antifongique constitue un axe important de recherché que se disputent plusieurs laboratoires de très haut niveaux. Les actions antifongiques des métabolites de ces plantes dépendent essentiellement de la présence des agents bioactifs variés appartenant à différentes classes chimiques, en l'occurrence les huiles fixes qui se caractérisent par la largeur de leurs spectres antimicrobiens.

De nombreux travaux ont confirmés l'aptitude d'un large spectre de plantes et de leurs extraits à réduire voir inhiber la croissance des souches fongiques notamment les *Aspergelli* toxigènes. Dans ce continuum de thématique le présent travail s'inscrit dans le cadre de l'évaluation de l'effet antifongique des huiles extraites des graines de chacune des plantes: *Citrullus colocynthis* L., *Linum usitatissimum* L. et *Nigella sativa* L. L'investigation antifongique a aussi porté sur l'effet combinant ces huiles en vue de trouver un probable effet antifongique synergique de ces entités lipidiques. Il a aussi été question de tester le pouvoir antifongique de la fraction majoritaire de leurs esters méthyliques d'acides gras sur deux souches fongiques toxigènes (*Aspergillus flavus* et *Aspergillus ochraceus*).

L'exploitation des résultats de l'activité antifongique des différentes fractions lipidiques extraites des graines des plantes étudiées, révèle que l'intensité de cette activité a été variable selon plusieurs facteurs entre autre la méthode utilisée (ajout de concentrations des huiles directement au milieu de culture ou la méthode de dilution selon **REMMAL et al (1993)**, la recherche sur milieu solide ou milieu liquide), selon l'huile expertisée (vis a vis de la composition et l'aspect physico-chimique de ces huiles), mais aussi selon la souche investiguée a savoir *Aspergillus flavus* ou *Aspergillus ochraceus*.

Les résultats de l'étude préliminaire de l'effet antifongique obtenus par l'adjonction des différents volumes des huiles au milieu de culture solide PDA (Potatos Dextrose Agar): méthode de croissance radiale révèlent que l'ensemble de nos huiles ont exercées un effet plus ou moins efficace sur la croissance de les souches testées. En effet, les huiles ont induit une efficacité variable sur les souches. Cet effet antifongique s'est manifesté par un retard de croissance vis a vis du témoin, par ailleurs, ce retard de croissance a été beaucoup plus marqué sur la souche *Aspergillus flavus*. L'huile de *Linum usitattissimum* L. a présentée l'indice antifongique le plus élevé (43%) par rapport aux deux autres huiles dont leurs indices antifongiques ont été respectivement 33.1% et 28% pour l'huile de *Citullus colocynthis* L. et l'huile de *Nigella sativa* L.

L'exploitation des resultats de l'activité antifongique de ces fractions lipidiques extraites

des graines des plantes médicinales par la méthode de **REMMAL et al (1993)**, a révélée une nette amélioration du pouvoir antifongique de ces huiles sur les souches *Aspergillus* testées. Les indices antifongiques enregistrés sur *A.flavus* pour les différentes huiles ont été: de 40.63%, 47.01% et 31.94% respectivement pour l'huile extraites des grains de *Citrullus colocynthis*, *Linum usitatissimum* et *Nigella sativa*.

Il faut aussi signaler que l'effet antifongique des différentes huiles sur la souche fongique *A.ochraceus* à lui aussi été amélioré. En effet, les indices antifongiques de l'huile de *Linum usitatissimum* et *Nigella sativa* enregistrés ont été de l'ordre de 51.04% et 23.93%. Cette différence de résultats a été allouée selon **REMMAL et al (1993)** et **SATRANI et al (2001)** à la méthode adoptée. En effet, du fait de la non-miscibilité de nos substrats à l'eau et donc au milieu de culture, la mise en émulsion grâce à une solution d'Agar à 0,2 % permet de favoriser le contact germe/composé et de ce fait renforcer l'action antifongique.

Le pouvoir antifongique des huiles à été aussi variable selon l'huile utilisée. En effet, l'action inhibitrice induite par les huiles extraites des graines de *Linum usitatissimum* L. et ceux de *Citrullus colocynthis* L. s'est révélé plus importante que celle de l'huile des graines de *Nigella sativa* L. quoique les analyses spectrales CPG/SM effectuées sur ces huiles n'ont pas montré de différences très significatives sur le plan de la composition, cette dernière s'est révélé d'une riche en esters méthyliques d'acides gras et en acides gras. Il faut aussi noter que le comportement viscosimétrique des trois fractions lipidiques à été selon l'étude réalisée presque obéissant à la même conformation et au même comportement rhéologique. **YINGYING et al (2008)** ont montré qu'à la concentration 6% de poudre des graines de *Linum usitatissimum* L. inhibe totalement le développement d'*Aspergillus flavus* (100%), cette activité peut être due à sa richesse en acides α -linoléique (C18:2) à ce propos **DALE et al (2004)** ont confirmé la contribution de ces acides gras dans la réduction de la croissance des *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Pyrenophora avenae* et *Crinipellis perniciosa*.

En ce qui concerne l'huile extraite des graines de *Citrullus colocynthis* L. plusieurs études ont prouvé leur activité antimicrobienne notamment le travail de **BELSEM et al (2009)** et **MERZOUK et al (2009)**, où l'on a constaté que les extraits des fruits de cette plante ont présenté un large spectre antifongique. Dans le même sens **GACEM et al (2009)** ont montré que l'extrait aqueux de la pulpe inhibe la croissance d'*Aspergillus flavus* avec un indice antifongique de l'ordre de 82%.

Selon ces travaux et suivant la richesse de l'huile des graines de cette plante en acide linoléique (67 à 73%), constat prouvé par **SCHAFFERMAN et al (1998)**, il ressort que la réduction de la croissance de notre souche est probablement corrélée à la dominance de l'acide linoléique dans l'huile. À la lumière de ces travaux on peut constater que l'activité antifongique de notre huile est probablement due à sa richesse en acide α -linoléique (C18:2).

Pour ce qui est de *Nigella sativa*, de nombreuses études ont montré que leurs graines présentent un large spectre d'inhibition vis-à-vis de nombreuses souches fongiques ainsi **AGRAWAL et al (1979)** déclarent que l'huile fixe présente une excellente activité antifongique, notamment sur *Aspergillus niger*. **NAZRUL et al (1989)**, ont confirmé la capacité de l'huile essentielle des graines de *Nigella sativa* à inhiber la croissance d'*Aspergillus flavus* et de nombreuses autres souches fongiques, de plus **SINGH et al (2005)** ont montré ainsi l'activité inhibitrice de cette huile à l'égard d'*Aspergillus flavus* avec un indice antifongique de 73.3% à la concentration 6 μ l/ml d'huile ajoutée dans le milieu.

en raison de la richesse des graines de *Nigella sativa* L. en thymoquinone, composé actif qui est minoritaire dans l'huile des études de son activité antifongique ont été entrepris. **AL-JABRE et al (2005)**, ayant étudié l'activité antifongique de thymoquinone sur *Aspergillus niger* ont trouvé qu'à la concentration 2mg/ml de thymoquinone ajoutée dans le milieu et au 7^{ème} jour d'incubation le pourcentage d'inhibition était de l'ordre de 100%. Dans ce même sens **AKHTAR et al (2007)** ont montré la capacité de ce composé à inhiber la croissance totale de *Fusarium solani*. Selon ces études il ressort que l'activité antifongique de notre huile est probablement due à la thymoquinone.

Selon ces observations, l'hypothèse est que l'huile extraite des graines de *Linum usitatissimum* L. a un effet particulièrement efficace sur l'inhibition de la croissance mycélienne et elle a peu d'effet sur la sporulation, alors que l'huile de *Citrullus colocynthis* L. qui est presque dénuée d'effet sur la sporulation apparaît moyennement efficace sur l'inhibition de la croissance mycélienne, à l'encontre l'huile de *Nigella sativa* L. apparaît très efficace sur la sporulation et dans une moindre mesure sur l'inhibition de la croissance mycélienne.

Au terme de cette étude, l'hypothèse est que l'activité antifongique observée pour les trois huiles peut être attribuée à leurs richesses en acides gras notamment l'acide linoléique et linoléique. Les résultats de la CPG/SM confirment en partie cette hypothèse. En effet, ces huiles sont très riches en acides gras polyinsaturés types linoléique et linoléique.

L'analyse par chromatographie a révélée aussi la présence d'une proportion importante d'acide gras saturés tels l'acide palmitique et stéarique. L'effet antifongique peut être fruit aussi d'une synergie de ces acides gras ou bien les différents constituants de ces huiles.

Dans cette tendance d'hypothèse, nous avons essayé d'investiguer l'éventuel effet antifongique synergique des huiles extraites des plantes médicinales étudiées. En effet, différentes combinaisons de ces fractions huileuses ont fait l'objet d'une recherche de l'effet antifongique.

Les résultats de cette exploration ont révélé que l'effet antifongique a été pour quelques combinaisons amélioré. En effet, l'ajout des trois huiles (HC/HL/HN) à volumes égales au milieu de culture a fourni les meilleurs indices antifongiques dans ces essais de synergie. L'effet antifongique synergique des trios huiles a été prononcé pour les deux souches *A.flavus* et *A.ochraceus*. Les indices antifongiques enregistrés ont été de 38.57% et 31.47% respectivement pour *A.flavus* et *A.ochraceus*. Par ailleurs l'effet antifongique synergique a été proportionnel aux concentrations des combinaisons d'huiles ajoutées au milieu de culture (Coefficient de corrélation $R^2=0.85$ pour *A.ochraceus*). A ce stade de la recherche nous ne savons pas lequel des fractions ou huile a réagi, ni quel est le mode de synergie.

L'emploi de l'enquête de viscosité nous a aidé à expliquer le comportement des huiles utilisées séparément ou en plusieurs formules synergiques. Les concentrations requises pour un éventuel effet antifongique correspondait à la concentration optimale C^* . À ces concentrations, la chaîne carbonée des huiles couvre l'espace de solution (**FLORY, 1971**). Selon les résultats de **BENMANSOUR et al. (2003)**, les chaînes sont impénétrables et forment des micelles temporaires à des concentrations élevées ($C > C^*$). Le comportement des huiles dans les différents systèmes de solutions selon **DOI & EDWARDS (1986)**, montre la présence de trois domaines ($C > C^*$, $C = C^*$, $C < C^*$).

La conception du comportement viscosimétrique des huiles étudiées a permis de mettre en évidence la zone de concentration idéale pour optimiser l'activité antifongique synergique et donc comprendre le comportement de ces huiles ensemble pour préconiser les concentrations micellaires critiques pour une possible activité antifongique synergique. Dans ce domaine, la discussion doit se faire dans le domaine de ($C = C^*$), dans cette zone, la chaîne carbonée de l'huile est plus étalée et plus souple, et d'agir en meilleure manière que

les autres gammes. Ces résultats confirment les rapports de **REGALADO et al (1999)** et **BENMANSOUR et al (2003)** qui ont montré que l'effet de chaînes plus longues a augmenté la viscosité d'une manière exponentielle (**ALLOUCHE, 2003**). Ce résultat montre clairement l'importance du paramètre de viscosité qui nous a informé sur les variations de conformations des macromolécules en solution. En effet, cette technique a confirmé la présence des intra et/ou inter associations moléculaires entre les chaînes d'huiles.

Il est important de souligner que l'étude de l'effet synergique des huiles n'a pas été réalisé à travers l'emploi des concentrations C^* ou l'huile possède le meilleur comportement de la chaîne carbonée de C^* . Cette étude ouvre la voie à de nouvelles investigations pour tester l'effet synergique de l'étude huiles en utilisant les valeurs obtenues C^* , identifier, purifier les molécules actives, déterminer l'activité antifongique et élucider le mécanisme de molécules purifiées antifongiques.

Confirmer les hypothèses déjà émises en ce qui concerne l'effet antifongique des huiles extraite des trios plantes médicinales étudiées dans notre cas, nous a poussé à étudier l'activité antifongique des fractions d'esters brutes et majoritaires extraites des différentes huiles. L'extraction de ces fractions a été réalisée par réaction de saponification suivie d'une ésterification méthylique. L'action antifongique des différentes fractions des esters méthyliques d'acides gras séparées (brutes et majoritaires) ont été testées par les deux techniques à savoir l'évaluation de la croissance radiale sur milieu solide, et l'évaluation de la biomasse sur milieu liquide.

Les résultats obtenus par la méthode de l'évaluation de la croissance radiale révèlent que l'ensemble des esters bruts et majoritaires respectivement ont exercé un effet plus ou moins efficace sur la croissance des souches considérées. En effet, les différents esters présentent une action inhibitrice sur la croissance mycélienne avec un degré variable en fonction de la nature des esters des huiles investiguées. Par ailleurs l'effet des fractions d'esters méthyliques d'acides gras ou fractions majoritaires ont exercées des effets inhibiteurs plus importants que ceux bruts. Il est à noter que l'effet antifongique a été plus prononcé sur la souche d'*A.flavus* que *A.ochraceus*.

Cependant, les travaux réalisés sur l'activité antifongique des plantes en Indonésie par **SUZUKI et al (2011)**, ont montré que les furanoditerpènes « ester méthylique d'acide », isolés et identifiés à partir de la racine de *Arcangelisia flava* ont une forte activité antifongique contre un champignon responsable des pourritures blanches *Trametes versicolor* et un

champignon responsable de pourritures brunes *Fomitopsis palustris*. En outre, **LIMA et al (2011)**, ont montré que les esters méthyliques d'acides gras d'*Annonacornifolia* sont capables d'inhiber 12 souches cliniques de *Paracoccidioides brasiliensis* et ont également été actifs contre *Cladosporium sphaerospermum*. De même, les travaux de **CANALES et al (2011)**, avaient montré que l'*Acalypha monostachya* contient différents esters méthyliques d'acide gras ayant des activités antibactériennes et antifongiques.

L'analyse de nos résultats nous a permis d'escompter que les fractions d'esters méthyliques d'acides gras (FAME's) extraites des trois huiles ont un effet antifongique plus efficace sur les deux souches testées que les esters bruts. Ces résultats sont corroborés par les travaux de **HABULIN et al (2008)** qui avaient montré que les monoesters inhibent la croissance de *Bacillus cereus* en plus grande mesure que les diesters. En parallèle à ces résultats, les travaux de **AGORAMOORTHY et al (2007)** sur l'activité antimicrobienne des esters avaient affirmé que les extraits des esters méthyliques d'acide gras possédaient des activités antibactériennes et antifongiques contre un total de 11 micro-organismes dont 7 bactéries et 4 levures : *Bacillus pumilus*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aerogenosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, *C. krusei* et *C. parapsilosis*, *E. coli*, *C. tropicalis*, *B. subtilis* et *Staphylococcus aureus*.

Par ailleurs, les travaux réalisés par **CHANDRASEKARAN et al., en 2008** ont eux aussi mis en évidence l'action que les esters méthyliques d'acide gras extraits à partir de quatre plantes halophytes, à savoir, *Arthrocnemum indicum*, *Salicornia brachiata*, *Suaeda maritima*, et *Suaeda monoica* appartenant à la famille des Chénopodiacées, ont été projetés pour les activités antimicrobiennes. L'ester de *Salicornia brachiata* avait affiché les plus fortes activités antibactériennes et antifongiques. Ces mêmes auteurs en 2011 ont montré que les esters méthyliques d'acide gras extraits à partir de *Sesuvium portulacastrum* affichaient des fortes activités antimicrobiennes contre les micro-organismes pathogènes pour l'homme comme *A. fumigatus* et *A. niger* avec des concentrations de **16 mg/ml** et **8 mg/ml** respectivement, et avec une concentration de **0.25 mg/ml** contre *Bacillus subtilis*. Les travaux de **(SATYAN et al., 2008)**, les esters méthyliques d'acide gras de l'huile de Madagascar periwinkle (*Apocyanaceae*) contre *Helicoverpa armigera* sont dotés d'activité antifongique.

Le détail des résultats de l'activité antifongique des différentes fractions FAME's, révèle que les fractions extraites à partir de l'huile de *Linum usitatissimum* L. ont fournies les meilleurs indices d'inhibitions pour les deux souches fongiques toxigènes en particulier

celle d'*A.flavus* IAF 10 μL =54.19, IAF 20 μL = 53.19, IAF 50 μL = 51.69, IAF 60 μL =50.73. Les meilleurs indices enregistrés pour *A.ochraceus* ont été de l'ordre de : IAF 40 μL = 40.44, IAF 90 μL = 40.48. Les fractions d'esters FAME's isolées à partir de l'huile des graines de *Citrullus colocynthis* L. ont fourni des indices antifongiques de la même grandeur que les fractions précédentes avec un degré moindre. La fraction FAME's isolée à partir de l'huile de coloquinte a induit un effet antifongique beaucoup plus marqué sur la souche *A.flavus* (IAF 70 μL =51.34, IAF 80 μL = 51.17, IAF 90 μL = 50.89). L'effet sur *A.ochraceus* à été plus modéré (IAF 40 μL =28.37, IAF 50 μL = 28.90, IAF 100 μL = 28.52). Par ailleurs, l'effet antifongique portant sur l'action de la fraction FAME's extraite à partir de l'huile de *Nigella sativa* L. montre que l'effet inhibiteur de la croissance de cette fraction sur les souches fongiques toxigènes à été moins important que l'effet des deux premières fractions. Cet effet a été de l'ordre de IAF 10 μL =46.97, IAF 20 μL = 45.217, IAF 50 μL = 51.69, IAF 30 μL =45.32 pour l'*A.flavus* et IAF 40 μL =24.32, IAF 50 μL = 23.94, IAF 70 μL = 21.30 pour le cas d'*A.ochraceus*.

L'analyse de ces resultats, montre que l'effet antifongique des FAME's a été plus prononcé sur *A.flavus* que sur *A.ochraceus*. Ces résultats sont en corrélation avec le travail de (YINGYING et al., 2008), qui ont rapporté que la poudre de graines de *Linum usitatissimum* L. à une concentration de 6% pouvait inhiber complètement le développement de *A. flavus*. Les rapports précédents ont montré que les FAME's ont fournis des activités antibactériennes et antifongiques (LIMA et al., 2011 ; PIYUSHA et al., 2012).

Dans le même ordre d'idée, l'effét antifongique des FAME's extraites des huiles des graines de *Citrullus colocynthis* L. à été discuté par plusieurs travaux, notamment ceux de BELSEM et al (2009) qui avaient emi que les extraits du fruit de coloquinte ainsi que les esters methyliques de l'huile extraite de ces graines sont doués d'activité antifongique. Par ailleurs, l'efficacité antifongique des FAME's isolées de l'huile de *Nigella sativa* L. à été mise en evidence par les travaux d'AL-JABRE et al. (2005) et AKHTAR et al. (2007) qui avaient annoncé que ces fractions sont dotées d'activités biologiques très variées et pouvaient inhiber un large spectre de propagules fongiques preferentiellement les *Aspergillus*.

En ce qui concerne l'évaluation de la biomasse sur milieu liquide, l'apport simultané sur le milieu de culture des différentes concentrations des huiles investiguées ainsi que les FAME's, n'a pas révélé les resultats escomptés et ce par rapport aux resultats de l'activité antifongique sur le milieu solide. En effet, les poids des biomasses fongiques formées sont

assez variables est globalement supérieures par rapport aux contrôles particulièrement pour l'ajout des huiles brutes. Néanmoins, une légère diminution de poids a été remarquée en ce qui concerne l'ajout de l'huile de *Linum usitatissimum* et l'huile de *Citrullus colocynthis* à la concentration 80µl/ml d'huile. Ces résultats peuvent être expliqués par la quantité d'inoculum ajouté au milieu de culture ou bien, il est très probable que la souche a utilisé l'huile comme source de carbone. La réduction notée peut être due à l'abondance des acides linoléique et linolénique dans ces huiles cette abondance a été mise en évidence par l'exploration CPG/SM des huiles. Cette hypothèse a été confirmée par **DALE et al (2004)** ayant trouvé une réduction du poids de la biomasse à une concentration de 100 µl/ml. Pour l'huile de *Nigella sativa* L., les poids des biomasses formés sont plus ou moins fluctuants. La diminution des poids des biomasses a été observée aux concentrations 80µl et 100µl/ml d'huile. Notons que Les travaux d'**AL-JABRE et al. (2005)** et **AKHTAR et al. (2007)** ont rapporté que cette diminution serait probablement due à la richesse de cette huile en Thymoquinone.

Pour ce qui est de l'évaluation de l'effet antifongique des fractions d'esters méthyliques sur milieu liquide, l'investigation des différents résultats montre que ces fractions n'ont pas donné les résultats attendus comparativement à ceux obtenus en milieu solide. En effet, les indices antifongiques enregistrés ont été très faibles et n'ont pas dépassé les 15%. Ces résultats sont en contradiction par rapport à ceux trouvés par (**DALE et al., 2004; AL JABRE et al., 2005; AKHTAR et al., 2007; YINGYING et al., 2008; CANALES et al., 2011; LIMA et al., 2011**) ayant trouvés une réduction considérable des biomasses sous l'effet des fractions d'esters méthyliques.

L'analyse des différents résultats ont prouvé encore une fois l'efficacité antifongique des esters méthyliques extraites de l'huile de *Linum usitatissimum* L.. En effet, un retard de croissance a été détecté aux différentes concentrations de FAME's de *Linum* étudiées. Il est à signaler que les autres fractions d'esters (FAME's de *Citrullus colocynthis* et *Nigella sativa*), ont exercé des effets antifongiques plus modérés comparativement aux fractions extraites de l'huile de lin. Par ailleurs, ce retard de croissance a été beaucoup plus marqué sur la souche d'*A.flavus* contrairement à *A.ochraceus* qui a manifesté une certaine résistance vis à vis de ces fractions d'esters.

En fin, nous pouvons dire que les résultats de l'évaluation de l'activité antifongique des huiles étudiées ainsi que les fractions d'esters ne constituent qu'une étape préliminaire. L'évaluation de l'action antifongique est de beaucoup plus testée sur milieu solide et ce du fait que l'évaluation sur milieu liquide de la biomasse présente plusieurs inconvénients (la miscibilité, le contact inoculum-substances bioactives...).

A ce stade de l'analyse, nous n'avons pas encore une explication claire et crédible sur la différence perçue entre les deux techniques d'évaluation de l'activité antifongique mais il est sûr que cette différence n'exclut en rien les aptitudes antifongiques de ces entités. Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour aiguïser ce sujet. La première, les fractions FAME's ne réagissent pas de la même façon sur milieu solide que sur un milieu liquide et ce faute de caractéristiques physicochimiques. La seconde, il est plus préférable de réaliser l'évaluation de l'effet antifongique sur milieu liquide sous une incubation agitée, ce qui augmentera l'homogénéisation du milieu de culture et donnera un meilleur contact champignon-fractions bioactives. Une troisième hypothèse peut être émise, en effet, la présence d'une source de carbone (sucrose à 10g/l) dans le milieu de culture PDBa ne favorise pas l'utilisation de la fraction testée. De ce fait, la réduction voire l'élimination de cette source de carbone facilement assimilable pourrait pousser les champignons à utiliser une autre source de carbone dans le milieu (FAME's) ce qui nous renseignera sur la possibilité d'avoir une action antifongique.

En conclusion, en raison de la complexité de la composition chimique des huiles, il est difficile de donner une idée précise sur leur mode d'action antifongique. Il est fort probable aussi que chacun des constituants possède son propre mécanisme voire un cas d'antagonisme probable. Il est bien connu aujourd'hui que l'action antifongique des substances dotées de pouvoir antifongique ont pour cible préférentielle la membrane cytoplasmique (**CAROLINA et al., 2011**). A ce sujet nous avons essayé de vérifier l'hypothèse que l'action antifongique de ces huiles est allouée aux fractions d'esters méthyliques d'acides gras présentes en grande quantité dans ces huiles. Nous croyons également que l'effet antifongique peut être dû à l'abondance des acides linoléique et linoléique de ces huiles (**MUELLER et al., 2010**). Cette hypothèse a aussi été confirmée par (**SHEN et al., 2012 ; CHOI et al., 2012 ; NEHDI et al., 2013**).

Les résultats de la présente étude indiquent que les FAMEs analysés possèdent des propriétés antifongiques qui pourraient être utilisés sur diverses maladies dont les symptômes pourraient impliquer les infections fongiques et des champignons de stockage et altération des aliments dans les aliments domaine de l'industrie. En outre, la recherche phytochimique est nécessaire pour identifier l'acide gras actif responsable de l'antifongique effet.

Chapitre 5

étude in vivo de l'effet régulateur des huiles (huile de Citrullus colocynthis, huile de Nigella sativa) chez le rat intoxiqué par des mycotoxines

Chapitre 5

ETUDE IN VIVO DE L'EFFET REGULATEUR DES HUILES (HUILE DE CITRULLUS COLOCYNTHIS, HUILE DE NIGELLA SATIVA) CHEZ LE RAT INTOXIQUE PAR DES MYCOTOXINES

5.1 Introduction

Les mycotoxines sont "des produits naturels, synthétisés par les champignons, capables de provoquer une réponse toxique lorsqu'ils pénètrent par voie naturelle (ingestion, inhalation ou absorption par la peau) chez l'animal ou dans l'organisme humain (**BENNETT, 1987**). Les mycotoxines retiennent l'attention dans le monde entier en raison des pertes économiques importantes qui sont liées à leurs effets sur la santé de l'homme, la productivité animale et le commerce national et international.

La découverte des aflatoxines a révélé que certaines moisissures étaient capables de synthétiser des substances toxiques responsables de pathologies chez l'homme (**PFOHL-LESZKOWICZ, 1999**). Plusieurs milliers de mycotoxines ont été identifiées mais heureusement, seules une vingtaine de familles posent des problèmes en alimentation humaine et animale (**PFOHL-LESZKOWICZ & CASTEGNARO, 2005**). Six familles sont fréquemment rencontrées en agro-alimentaire : les aflatoxines, les ochratoxines, les fumonisines, les trichotécènes, la zéaralénone et la patuline.

Ces mycotoxines sont présentes dans toute une série de produits de l'alimentation humaine et animale et provoquent de nombreuses maladies chez l'homme et l'animal (**CASTEGNARO, 1995; COKER, 1997 ; PFOHL-LESZKOWICZ, 1999**). L'exposition aux mycotoxines peut être à l'origine de toxicités aiguës et chroniques allant de la mort à des effets délétères sur le système nerveux central, l'appareil cardiovasculaire et l'appareil respiratoire, ainsi que sur les appareils digestif et urinaire. Elles peuvent aussi avoir des effets cancérigènes, mutagènes, tératogènes et immunosuppresseurs (**CASTEGNARO et al., 1999**). Le pouvoir qu'ont certaines d'altérer le système immunitaire et, ainsi, de réduire la résistance aux infections, est maintenant largement considéré comme leur effet le plus important. Les mycotoxines sont aussi associées au développement de cancers (ex foie/AFB en Afrique).

Depuis de nombreuses années, les cancérologues pensent que des facteurs alimentaires sont impliqués dans l'étiologie de certains cancers (approximativement 35% des cancers) (**HIRAKU et al.,1998**). De très nombreuses données épidémiologiques ont montré des associations fréquentes entre la consommation de certains aliments et l'incidence de certains cancers; par exemple, le cancer du foie et la contamination en aflatoxine B₁ (**PFOHL- LESZKOWICZ et al.,1999**). la question de l'implication de ces mycotoxines dans les cancers des voies urinaires est posée (**CHERNOZEMSKY et al., 1987 ; PETKOVA-BOCHAROVA et al., 1988 ; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 2002 ; PFOHL- LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007**).

Le mécanisme par lequel ces toxines induisent des cancers n'est pas totalement élucidé et fait l'objet de débats (**O'BRIEN & DIETRICH, 2005 ; MANDERVILLE, 2005 ; TURESKY, 2005 ; MANDERVILLE & PFOHL-LESZKOWICZ, 2006 ; PFOHL-LESZKOWICZ & MANDERVILLE, 2007**). Les substances cancérogènes peuvent agir selon deux types de mécanismes: selon un mécanisme génotoxique (capable de provoquer des dommages à l'ADN) ou un mécanisme épigénétique. Le terme épigénétique définit les modifications transmissibles et réversibles de l'expression des gènes ne s'accompagnant pas de changements des séquences nucléotidiques.

Les aflatoxines sont produites par des *Aspergillii* se développant entre autres sur les céréales et les oléagineux dans des atmosphères chaudes et humides. L'exposition chronique aux aflatoxines (AF) est responsable de cancers chez diverses espèces animales. Non seulement, l'AFB₁ mais également le mélange des quatre aflatoxines (B₁, B₂, G₁, G₂) induit des tumeurs hépatiques aussi bien chez la souris que le rat, mais également chez le canard, la truite, le saumon et le singe (**CASTEGNARO et al., 1999**). En général, il s'agit de cancer primaire du foie, néanmoins des tumeurs des reins, de la vésicule biliaire, du pancréas, de la vessie peuvent avoir lieu ainsi que des leucémies. La fréquence de tumeurs rénales et d'adénome du colon, est augmentée en cas de déficience en vitamine A. Le pouvoir cancérogène des AF dépend de leur structure chimique. Ainsi l'AFB₁ est le plus puissant cancérogène hépatique, alors que l'AFG₁ induit plutôt des tumeurs rénales. Les cancers primaires du foie sont caractérisés par des carcinomes hépatocellulaires, des cholangiosarcomes et des hépatoblastomes.

L'aflatoxine a un effet co-carcinogène avec le virus de l'hépatite B sévissant souvent dans les mêmes zones. De plus, l'inhalation de poussière contenant des AF est responsable de tumeurs du système respiratoire. Ainsi, des associations entre cancer et exposition professionnelle à des mycotoxines ont été mises en évidence. L'interaction ADNtoxine est le point clef dans le développement du processus de cancérogenèse. Il a été clairement démontré, lors d'études

expérimentales chez l'animal, que les aflatoxines se fixent sur l'ADN. L'AFB₁ après avoir été métabolisée en aflatoxine B₁-8,9-époxyde va réagir avec la guanine au niveau de l'azote en position 7 pour donner le trans-8,9-dihydro-8 (7-guanyl)-9- hydroxy-aflatoxine B (**PFOHL-LESZKOWICZ & CASTEGNARO, 2005**). Le dosage de cet adduit dans les urines constitue une méthode de détection d'une exposition récente à cette substance. L'AFB₁ n'est pas la seule mycotoxine à provoquer des dommages à l'ADN. Les AF sont mutagènes dans tous les tests.

In vivo, la preuve de la génotoxicité de l'OTA a été amenée par l'observation de cassures simples des brins de l'ADN, du rein, du foie, et de la rate de souris Balb C ayant reçu de l'OTA par voie intrapéritonéale (2,5mg/kg), ainsi qu'à l'ADN de rein et de foie de rat ayant reçu l'OTA par gavage (289µg/kg/48 heures pendant 12 semaines) (**CREPPY et al., 1985 ; KANE et al., 1986b**). L'OTA induit la formation d'adduits à l'ADN (**PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1991, 1993a 1993b, 1993c ; PETKOVA-BOCHAROVA et al., 1998 ; MILJKOVIC et al., 2002 ; PFOHL-LESZKOWICZ & CASTEGNARO, 2005**). Ces adduits à l'ADN n'ont pas été mis en évidence suite à l'exposition de rats à de l'OTA radiomarquée au tritium (**SCHATTLER et al., 1996 ; GAUTIER et al., 2001 ; MALLY et al., 2004**) ; néanmoins, ces adduits à l'ADN ont été caractérisés par la méthode de post-marquage des adduits au ³²P, méthode dix fois plus sensible que celle faisant intervenir l'OTA radiomarquée, suite à une exposition à l'OTA (**MALLY & DEKANT, 2005**). La formation de ces adduits à l'ADN est dépendante de la dose testée (**PETKOVA-BOCHAROVA et al., 1998 ; MILJKOVIC et al., 2002 ; PFOHL-LESZKOWICZ & CASTEGNARO, 2005**). Les adduits apparaissent plus précocement au niveau du rein, après 8 heures, par rapport au foie ou à la rate, où ils ne sont détectés qu'après 24 heures. Ces adduits rénaux persistent au-delà de 16 jours alors qu'au niveau hépatique, la réparation est complète dès 5 jours (**PFOHL- LESZKOWICZ et al., 1993a ; PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1993b**). Des adduits, semblables à ceux observés *in vitro*, sont détectés à l'ADN de tumeurs rénales et de tumeurs de vessie d'individus Bulgares souffrant de BEN (**PFOHL-LESZKOWICZ et al., 1993c ; CASTEGNARO et al., 2006a ; PFOHL-LESZKOWICZ & CASTEGNARO, 2005 ; AZEMAR, 2000**). La synthèse de standards de l'OTA, OTA liée de façon covalente au carbone 8 de la guanine, a permis d'identifier, par Co-migration, les adduits formés suite à l'exposition à l'OTA sur l'ADN rénal : deux adduits ont été caractérisés comme étant formés par la liaison de la molécule d'OTA sur la guanine par un atome d'oxygène de l'OTA, ou par le carbone de l'OTA (**FAUCET- MARQUIS, 2005 ; FAUCET et al., 2004 ; PFOHL-LESZKOWICZ & CASTEGNARO, 2005**). Les effets génotoxiques de l'OTA ont été décrits en détail (**MANDERVILLE & PFOHL-LESZKOWICZ, 2006 ; MANDERVILLE, 2005 ; TURESKY, 2005**).

Dans le cadre des stratégies curative (Décontamination), **JEMMALI(1979)** et **PARK et al (1988)** ont proposé des critères spécifiques pour la validation des procédés de décontamination des mycotoxines dans les denrées alimentaires. Pour être considéré efficace, ce procédé doit répondre aux exigences suivantes :

- il doit inactiver, détruire ou éliminer la toxine
- il ne doit pas générer ou laisser de résidu toxique dans le produit
- il doit maintenir la qualité nutritive de l'aliment et doit être acceptable pour l'alimentation humaine et animale
- il ne doit pas modifier de façon significative les propriétés technologiques du produit
- il doit si possible détruire les spores et les moisissures.

Une autre stratégie consiste à limiter les effets toxiques de l'OTA par l'ingestion d'agents chélateurs de la toxine tels que la cholestyramine ou les aluminosilicates de sodium et de calcium hydratés (**KERKADI et al., 1999 ; PLANK et al., 1990 ; HUFF et al, 1992 ; HUWIG et al, 2001**), ou par l'ajout d'additifs alimentaires (vitamines, graines de sésame, aspartame, mélatonine, piroxicam ou acides lactiques et sorbiques) contribuant à une protection partielle de l'organisme à la toxicité de l'OTA (**GROSSE et al., 1997a ; STOEV et al., 2002 ; CREPPY et al., 1995 ; MEKI & Hussein, 2001 ; BAUDRIMONT et al., 1995 ; LACIAKOVA et al., 1999**).

Le développement incontrôlé de la flore fongique contaminant un aliment, qu'il soit d'origine végétale ou animale, peut aboutir à la production et à l'accumulation de métabolites toxiques, les mycotoxines (**PFOHL- LESZKOWICZ et al., 1993a**). Plusieurs stratégies biologiques ont été décrites pour l'élimination des mycotoxines présentes sur des matrices consistant en une séquestration de la toxine ou une élimination de leurs effets par piégeage de ces molécules fongiques toxique par l'utilisation des adsorbants minéraux (charbon actif, argile certains polymères...). Certaines études ont suggérés l'utilisation des adsorbants biologiques (des levures et leurs dérivés, des bactéries lactiques) cherchant ainsi à obtenir une bonne efficacité et une meilleure spécificité d'adsorption tout en diminuant l'impact sur la qualité nutritionnelle des aliments par rapport aux adsorbants minéraux (**PFOHL-LESZKOWICZ & CASTEGNARO, 2005**). L'évaluation du risque lié à la présence de ces contaminants naturels dans les aliments nécessite la réalisation d'intoxications expérimentales afin de caractériser l'impact de la toxicité de ces molécules et de pouvoir définir les doses sans effet et les doses tolérables dans les aliments.

Une des voies de la recherche actuelle est le recours à la pharmacopée traditionnelle fondée sur l'utilisation des plantes médicinales, de leurs métabolites et leurs extraits dont l'utilisation est actuellement très convoités dans de nombreuses recherches biologiques particulièrement *in vivo*.

Sur un effort d'investigation pour la recherche d'une éventuelle solution naturelle, notre travail est motivé par l'étude d'une piste utilisant les huiles des plantes médicinales pour contrecarrer l'impact toxicologique et la palette des effets néfastes des mycotoxines.

Ce travail a pour vocation d'étudier l'impact des huiles extraites à partir de deux plantes médicinales *Citrulluscolocynthis* L., et *Nigellasativa* L. par leur incorporation dans un régime alimentaire de rat de souche *wistar* intoxiqué par des mycotoxines en vue d'étudier l'effet régulateur probable de ces fractions lipidiques.

5.2 Résultats

5.2.1 Évolution du poids corporel moyen et gain de poids

Les valeurs moyennes de l'évolution du poids des différents lots de rats étudiés et représentées dans les figures 5.1 et 5.2. Une diminution du poids corporel a été observé chez tous les lots de rats recevant les régimes étudiés et ce par rapport au lot de rats témoins (**HT**) 4%. Cette diminution a été plus importante pour les lots recevant l'huile extraite des graines de *Nigella sativa* L. (**HN**) que ceux recevant l'huile extraite des graines de *Citrullus colocynthis* L. (**HC**) et ce a raison de 4% dans chaque régime.

Il est a noté que les lots de rats intoxiqué par les différentes mycotoxines ont montré une perte de poids, cette perte a été beaucoup plus importante dans le cas de l'aflatoxine AFB₁ comparativement a la perte de poids engendrée par l'ajout de l'ochratoxine OTA. Cette perte de poids a été nettement visible dans le cas de l'AFB₁ durant la quatrième semaine d'expérimentation.

En revanche, on remarque que l'ajout des différentes huiles végétales extraites des graines de *Citrullus colocynthis* L. (**HC**) et l'huile extraite des graines de *Nigella sativa* L. (**HN**) à engendrer un léger regain de poids par rapport aux lots intoxiqués respectivement pour les lots (**HC+AFB**) et (**HN+OTA**).

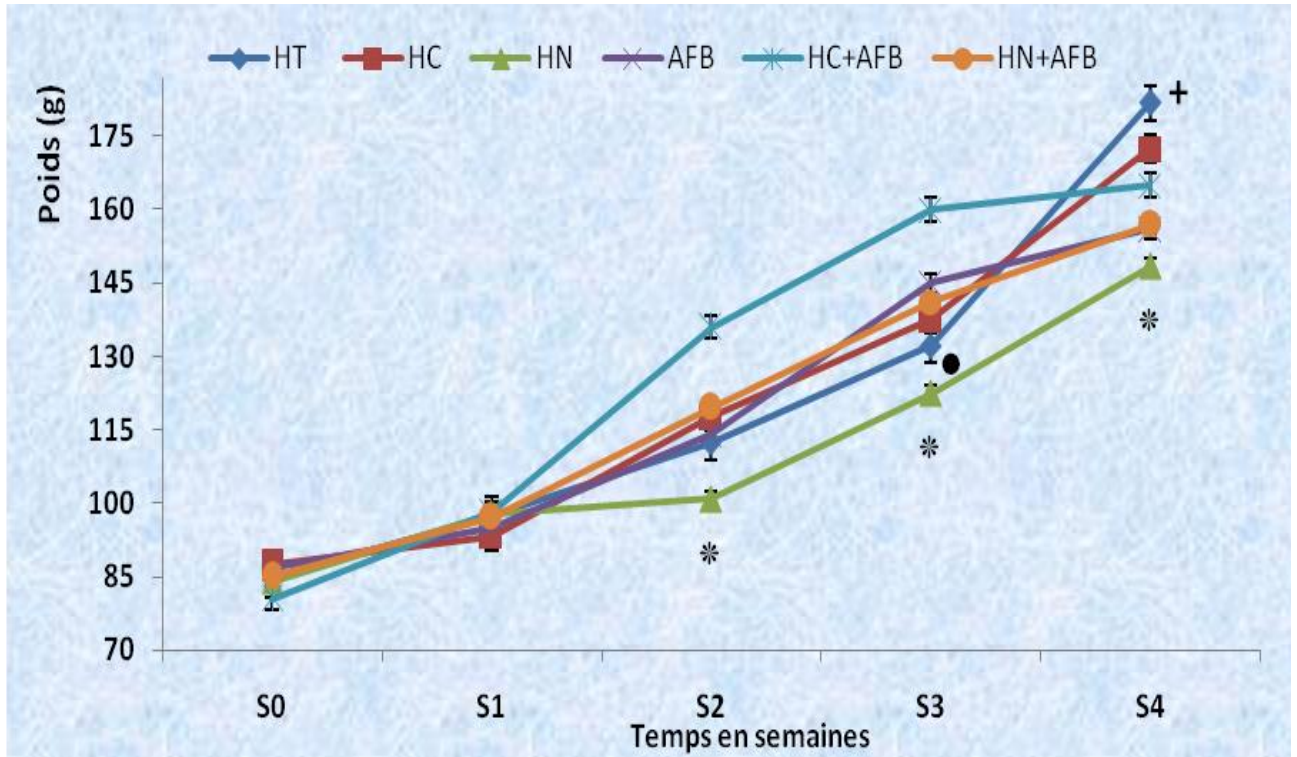


Figure 5.1 Évolution du poids corporel moyen (g) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires durant un mois d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en **moyenne ± ES** (n=5).

$P < 0.005$ * : différence significative entre HN et AFB

$P < 0.005$ • : différence significative HT et AFB

$P < 0.005$ † : différence significative HT / HC+AFB/ HN+AFB

HT témoin : Régime témoin (aliment standard +eau de source).

HC : Régime témoin (aliment standard) + eau de source.

HN : Régime témoin (aliment standard) + eau de source.

AFB : Régime expérimental (aliment standard contaminé par 125µg d'AFB) + eau de source.

HC+AFB : Régime expérimentale (aliment standard + 4% huile de coloquinte) + eau de source+125µg d'AFB

HN+AFB : Régime expérimentale (aliment standard+4%huile de nigelle) +eau de source+125µg d'AFB

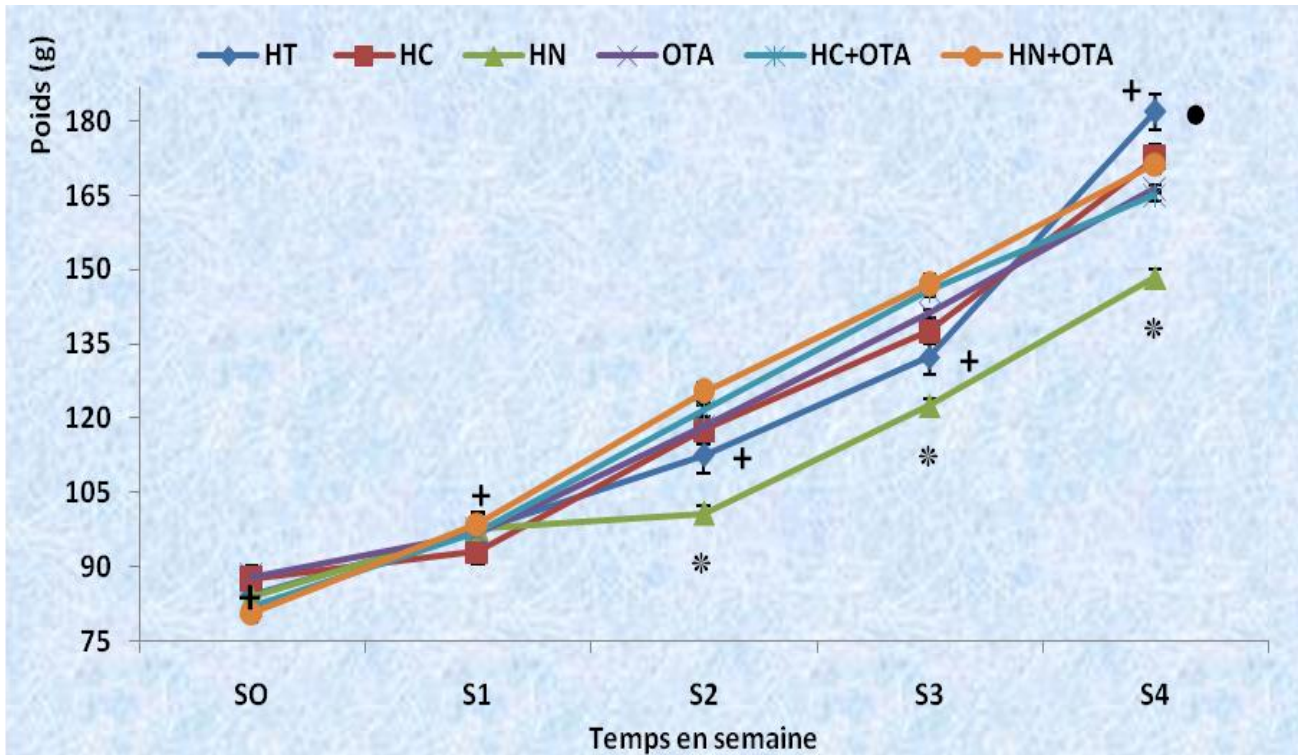


Figure 5.2 Évolution du poids corporel moyen (g) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires durant un mois d'expérimentation. Les valeurs sont exprimées en **moyenne ± ES (n=5)**.

$P < 0.005$ * : différence significative entre HN+OTA

$P < 0.005$ • : différence significative HT et OTA

$P < 0.005$ † : différence significative HT / HC+OTA

HT témoin : Régime témoin (aliment standard +eau de source).

HC : Régime témoin (aliment standard) + eau de source.

HN : Régime témoin (aliment standard) + eau de source.

OTA : Régime expérimental (aliment standard contaminé par 250µg d'OTA) + eau de source.

HC+OTA : Régime expérimentale (aliment standard + 4% huile de coloquinte) + eau de source+250µg d'OTA.

HN+OTA : Régime expérimentale (aliment standard+4%huile de nigelle) +eau de source+250µg d'OTA.

5.2.2 Quantité d'aliment et de toxine ingérée

La quantité moyenne d'aliment ingéré par des rats recevant le régime **(HC+OTA/ HC +AFB)** est significativement supérieur à celle des rats recevant les régimes **(OTA /AFB)** voir même vis a vis des rats recevant **(HC, HN)**. A la première semaine la quantité ingérée est de 15 grammes en moyennes chez les lots **(OTA), (AFB),(OTA+HC) et (HC+AFB)**.

Par ailleurs, la prise alimentaire chez les rats soumis aux régimes augmente progressivement jusqu'à atteindre les 20 grammes cet apport reste stable pendant toute la période d'expérimentation à l'exception du lot **(HN+AFB)** où la prise alimentaire diminue significativement à la dernière semaine de 50% environ.

Par conséquent, l'apport toxique total en mycotoxines a tendance à s'élever chez les rats nourris par le régime **(HC+OTA) et (HC+AFB)** par rapport aux autres groupes des rats suivit par l'**OTA/AFB** et **(HN+OTA) et (HN+AFB)**.

La prise de la toxine (AFB et/ ou OTA), diminue avec la diminution de l'apport alimentaire chez les rats **(HN+OTA) et (HN+AFB)** à la dernière semaine d'expérience.

5.2.3 Poids des organes

Les valeurs moyennes des poids des différents organes chez les différents groupes de rats étudiés représentées sur les tableaux 5.1 et 5.2 montrent la même cinétique d'évolution du poids des organes pour les différents groupes de rats en présence des deux toxines étudiées à savoir l'aflatoxine B1 ou l'ochratoxine A.

Les valeurs moyennes ne montrent aucunes différences significatives pour le rein et le cœur. Par ailleurs le poids du foie chez les rats recevant l'HC et/ou HN diminue significativement. Par contre, pour ces mêmes huiles en présence des toxines on a noté une augmentation du poids du foie. Les mêmes résultats ont été observés pour le cerveau.

Ce pendant, le poids du pancréas diminue significativement chez les rats en présence de l'AFB ou l'OTA ayant reçu Huile de *Citrullus colocynthis* ou Huile *Nigella sativa*. [HC+AFB] ou [HN+AFB] et [HC+OTA] ou [HN+OTA].

Tableau 5.1 Valeurs moyennes des poids des différents organes prélevés chez les différents groupes de rats étudiés intoxiqués par 125µg AFB1 (g/100 g pc)

ORGANES LOTS (n=5)	Foie	Pancréas	Cœur	Rein	Cerveau
HT	3.65±0.10	0,34±0,01	0,36±0,02	0.31±0.01	0.52±0.04
HC	3.13±0.14*	0.32±0.04	0.32±0.08	0.35±0.05	0.50±0.03
HN	3.19±0.32*	0.44±0.18	0.36±0.06	0.33±0.04	0.56±0.05
AFB	3.49±0.13+,*	0.47±0.06	0.37±0.03	0.34±0.03	0.89±0.03
HC+AFB	3.88±0.19	0.26±0.04+	0.35±0.02	0.33±0.01	1.26±0.05+
HN+AFB	3.72±0.09	0.18±0.02+	0.44±0.03	0.44±0.03	1.15±0.07+

P<0.005 * : Différences significatives HT/HC.

P<0.005 +,* : Différences significatives HT/AFB

P<0.005 + : Différences significatives HC+AFB et HN+AFB/AFB

HT témoin : Régime témoin (aliment standard +eau de source).

HC : Régime témoin (aliment standard) + eau de source.

HN : Régime témoin (aliment standard) + eau de source.

AFB : Régime expérimental (aliment standard contaminé par 125µg d'AFB) + eau de source.

HC+AFB : Régime expérimentale (aliment standard + 4% huile de coloquinte) + eau de source

HN+AFB : Régime expérimentale (aliment standard+4%huile de nigelle) +eau de source.

Tableau 5.2 Valeurs moyennes des poids des différents organes prélevés chez les différents groupes de rats étudiés intoxiqués par 250µg OTA (g/100 g pc)

ORGANES LOTS (n=5)	Foie	Pancréas	Cœur	Rein	Cerveau
HT	3.65±0.10	0,34±0,01	0,36±0,02	0.31±0.01	0.52±0.04
HC	3.13±0.14	0.32±0.04	0.32±0.08	0.35±0.05	0.93±0.11
HN	3.19±0.32	0.44±0.18	0.36±0.06	0.33±0.04	0.36±0.01●
OTA	4.05±0.53*	0.21±0.05*	0.37±0.03	0.31±0.02	0.89±0.03
HC+OTA	4.15±0.17+,*	0.32±0.04	0.34±0.02	0.42±0.07	1.86±0.01
HN+OTA	4.55±0.32+	0.22±0.02+	0.37±0.05	0.37±0.01	1.15±0.04

P<0.005 * : Différences significatives HT/HN/OTA

P<0.005 +,* : Différences significatives HT/HC+OTA

P<0.005 + : Différences significatives HT /HN+OTA

P<0.005 ● : Différences significatives HT /HC+OTA

HT témoin : Régime témoin (aliment standard +eau de source).

HC : Régime témoin (aliment standard) + eau de source.

HN : Régime témoin (aliment standard) + eau de source.

OTA : Régime expérimental (aliment standard contaminé par 250µg d'OTA) + eau de source.

HC+OTA : Régime expérimentale (aliment standard + 4% huile de coloquinte) + eau de source

HN+OTA : Régime expérimentale (aliment standard+4%huile de nigelle) +eau de source.

5.2.4 Analyses biochimiques des urines

Les résultats de la prospection biochimiques des urines des rats des différents lots obtenus à l'aide des bandelettes réactives à usage in vitro ne montrent aucune différences significatives entre les lots témoins et ceux expérimentaux pour la densité, le pH, les leucocytes, les protéines ainsi que pour le glucose et le sang. Néanmoins on a remarque une légère augmentation du taux des nitrites chez les lots intoxiqués par les mycotoxines en particulier celui de l'AFB comparativement aux lots témoins (HT), (HC) et (HN).

Tableau 5.3 Valeurs moyennes des paramètres biochimiques des urines chez les différents groupes de rats

PARAMETRES	LOTS MYCOTOXINE		HC 4%	HN 4%	LOTS INTOXIQUE TRAITÉ PAR HC		LOTS INTOXIQUE TRAITÉ PAR HN	
	AFB	OTA			HC+AFB	HC+OTA	HN+AFB	HN+OTA
	pH	8.3	8.1	8	8	8.5	8	7.6
Densité	1.01	1.01	1.1	1.03	1.00	1.00	1.010	1.020
Sang	---	---	---	---	---	---	---	---
Leucocytes	---	---	---	---	---	---	---	---
Protéines	++1	++1	++1	++2	++3	++2	++1	++1
Nitrites	+++	+++	traces	traces	traces	traces	traces	traces
Glucose	---	---	---	---	---	---	---	---

5.2.5 Analyses biochimiques du sang

5.2.5.1 Teneurs moyennes de la glycémie

A la fin de l'expérimentation, Les valeurs moyennes de glycémie restent dans les normes physiologiques chez la plupart des lots de rats et quelque soit le régime ingéré figures 5.3 (a et b). La lecture des teneurs moyennes des différents supports graphiques montre une légère baisse de ce paramètre pour les lots de rats chez intoxiqué par l'AFB et l'OTA, ainsi que les lots de rats recevant HC, mais elles restent toujours dans les normes physiologiques.

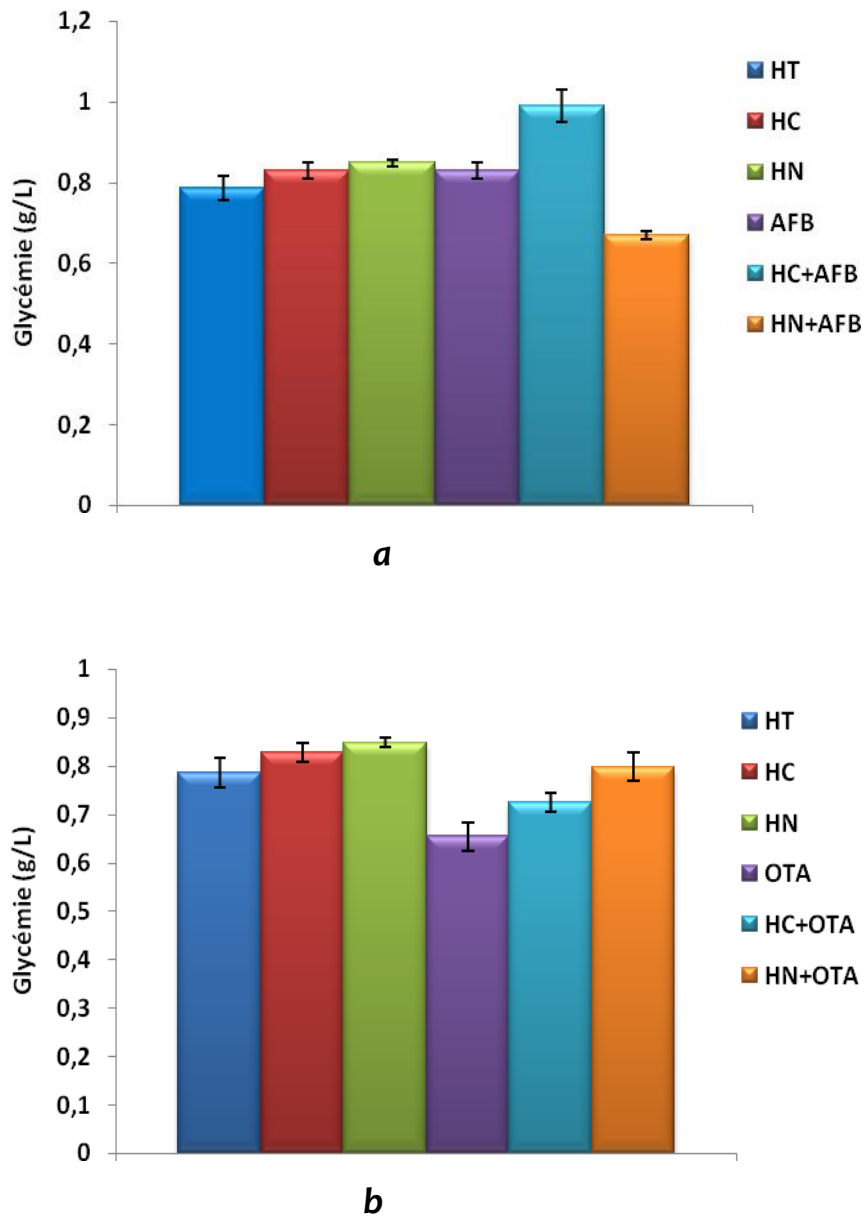


Figure 5.3 Teneurs plasmatique moyennes de la glycémie (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.

a : Rats intoxiqués par AFB _**b** : rats intoxiqués par OTA

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES

5.2.5.2 Valeurs moyennes de l'albumine

Les valeurs moyennes des taux d'albumine pour les différents lots de rats étudiés sont représentées sur les figures 5.4. On observe une diminution significative du taux moyen de l'albumine sérique chez les rats intoxiqués par l'AFB ainsi que les rats intoxiqués recevant l'huile de coloquinte (HC+AFB) ou l'huile de nigelle (HN+AFB).

Pour ce qui est de l'ochratoxine, les teneurs moyennes restent aux alentours des normes physiologiques quoiqu'une légère augmentation non significative du taux moyen de l'albumine sérique a été constaté chez les rats recevant un régime à base d'OTA avec ou sans supplémentation en huile de coloquinte (HC).

5.2.5.3 Valeurs moyennes des protéines totales

Concernant les valeurs de ce paramètre, la lecture des teneurs moyennes de protéines sériques représentées dans les figures 5.5. On constate une baisse significative du taux des protéines sériques chez le lot de rat intoxiqué par AFB par rapport au taux des protéines chez les rats témoins (HT). Cette diminution est aussi constatée chez les lots de rats recevant HC+AFB ainsi que celui HN+AFB.

Par contre aucune modification significative n'a été constaté concernant les lots recevant OTA ainsi que ceux HC+OTA ou HN+OTA par rapport au lot témoin (HT).

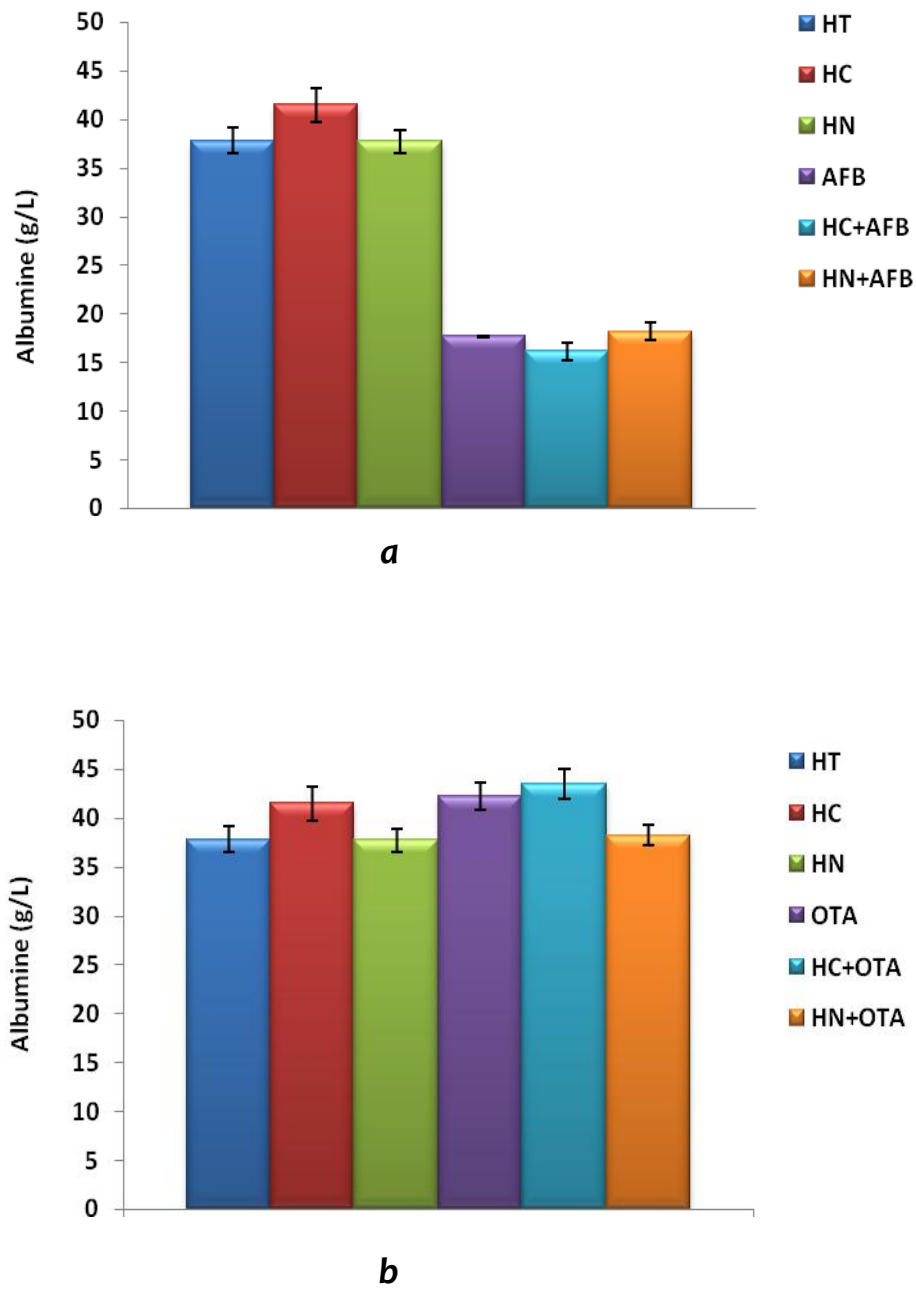
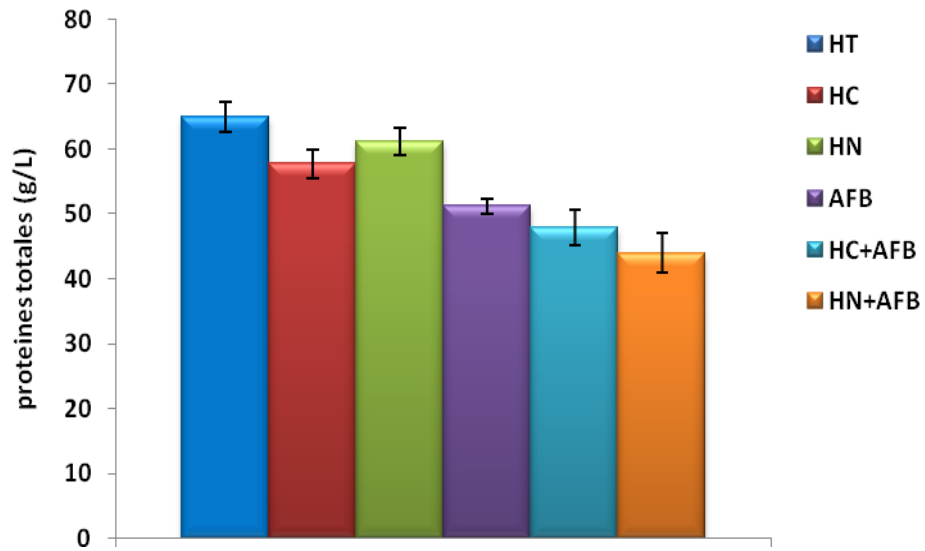


Figure 5.4 Teneurs moyennes de l'albumine sérique (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.
a : Rats intoxiqués par AFB _ **b** : rats intoxiqués par OTA
 Chaque valeur représente la moyenne ± ES



a



b

Figure 5.5 Teneurs plasmatique moyennes des protéines totales (g/L)chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.

a : Rats intoxiqués par AFB _ **b** : rats intoxiqués par OTA

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES

5.2.5.4 Valeurs moyennes des triglycérides et du cholestérol total

Les valeurs moyennes des triglycérides sériques sont représentées sur la figure 5.6. Une augmentation significative a été observée du taux des triglycérides chez les rats intoxiqués par AFB par rapport aux rats du lot témoin. Cette augmentation a été corrélée à une diminution du cholestérol chez les rats intoxiqués par AFB recevant l'huile de coloquinte (HC+AFB) ou l'huile de nigelle (HN+AFB) à 4% par rapport au lot de rat intoxiqué par AFB.

En ce qui concerne l'OTA, les valeurs moyennes de ces marqueurs lipidiques sont représentées sur la figure 5.7 et révèlent une perturbation de ces marqueurs lipidiques chez les rats intoxiqués par OTA. En effet l'on a noté la diminution des valeurs moyennes la triglycérodémie contrastant avec une élévation des teneurs moyennes de la cholestérolémie chez les rats intoxiqués par OTA par rapport aux rats du lot témoin.

Par contre, une amélioration voir une correction du bilan lipidique a été observée après suppléments des régimes intoxiqués par l'huile de coloquinte (HC+OTA) ou l'huile de nigelle (HN+OTA) à 4% ou une élévation du taux moyen des triglycérides en faveur d'une élévation de la cholestérolémie a été observée.

5.2.5.5 Valeurs moyennes de l'urée, des créatinines et de l'acide urique

L'analyse des valeurs moyennes de l'urée et de la créatinine représentés dans les figures 5.8 et 5.9, n'indique aucune modification significative pour ces deux marqueurs, néanmoins une légère augmentation de l'urémie a été constaté chez les rats recevant HC+AFB par rapport au lot témoin. Aucune notification n'a été détectée chez les rats intoxiqués par OTA.

Pour ce qui est des valeurs de la créatinine, une légère diminution du taux a été observé chez les rats des lots HC et HN. Par contre une augmentation importante a été notée après les régimes HC+AFB et surtout HN+AFB.

Les valeurs moyennes de l'acide urique sont représentées sur la figure 5.10 et ne montre aucunes différences significatives chez tous les types de régimes.

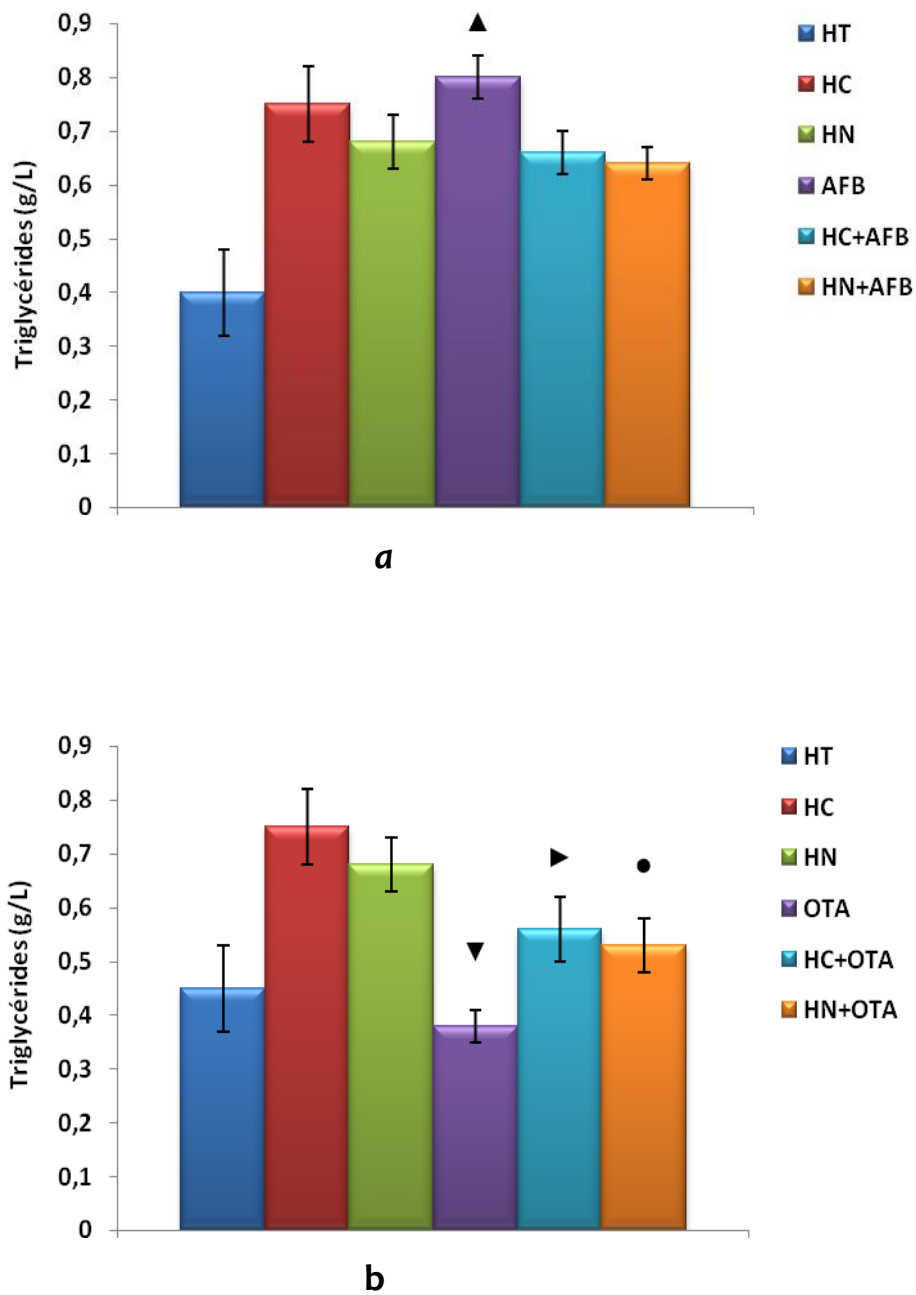


Figure 5.6 Teneurs sériques moyennes des triglycérides (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.

a : Rats intoxiqués par AFB _ **b** : rats intoxiqués par OTA

Chaque valeur représente la moyenne ± ES

P<0.005 ▲ : différence significative entre AFB et HT

P<0.005 ▼ : différence significative OTA et HT

P<0.005 ► : différence significative entre HC +OTA et OTA

P<0.005 ● : différence significative HN+OTA et OTA

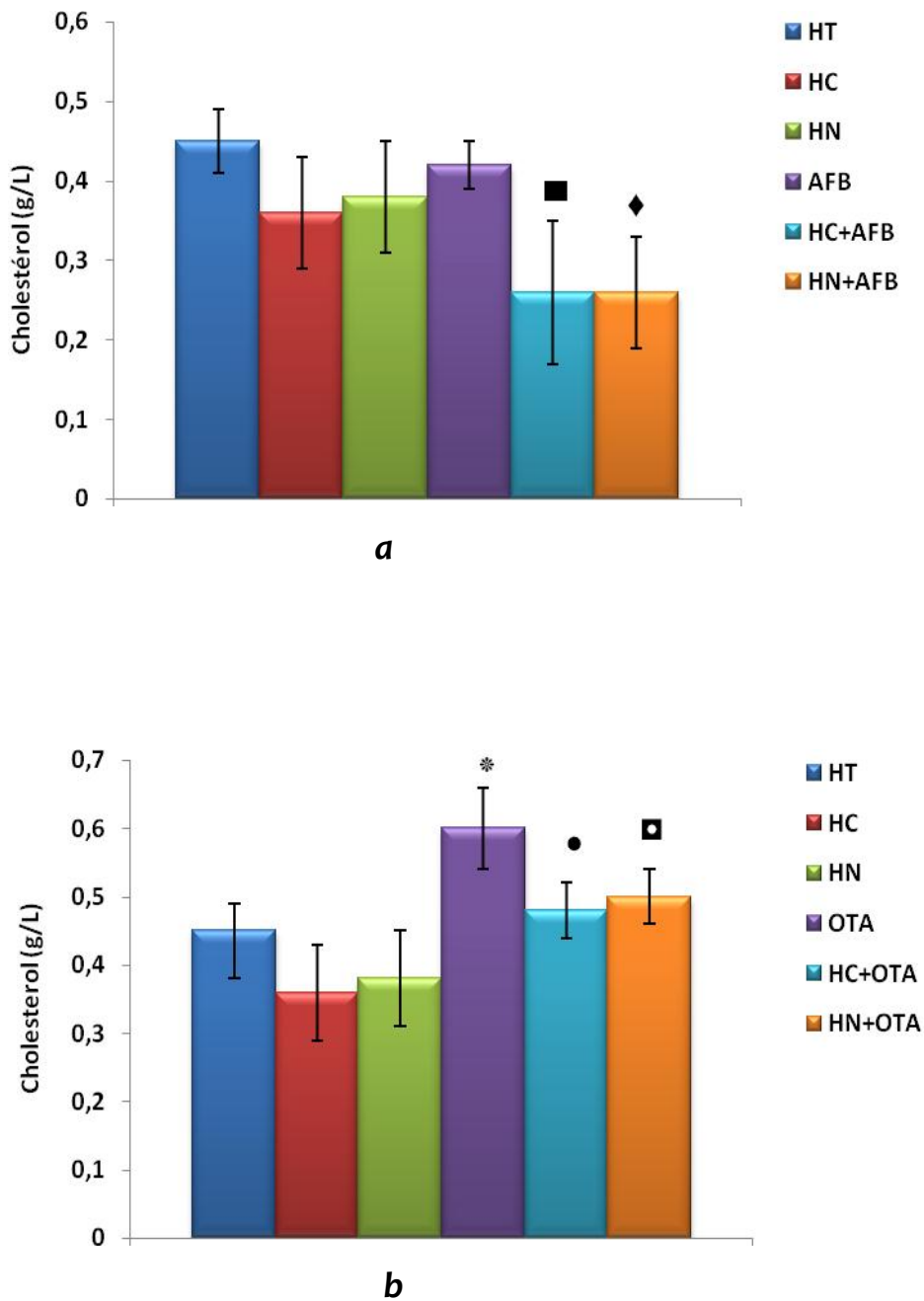


Figure 5.7 Teneurs sériques moyennes du cholestérol (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.

a : Rats intoxiqués par AFB **_b** : rats intoxiqués par OTA

Chaque valeur représente la moyenne ± ES

P<0.005 ■,◆ :différence significative entre HC+AFB et HN+AFB/ AFB

P<0.005 * :différence significative entre OTA et HT

P<0.005 ● :différence significative entre HC+OTA/HC

P<0.005 ◻ : différence significative entre HN+OTA/HN

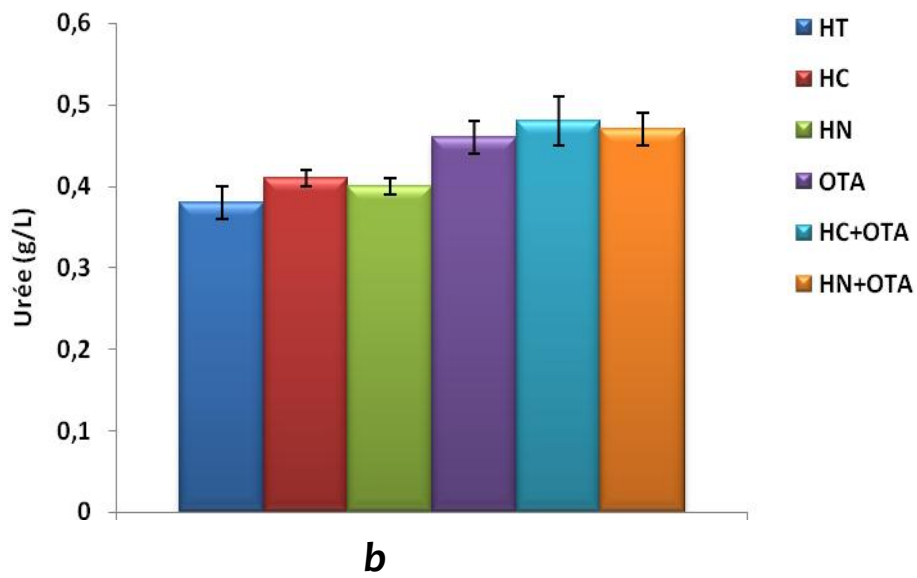
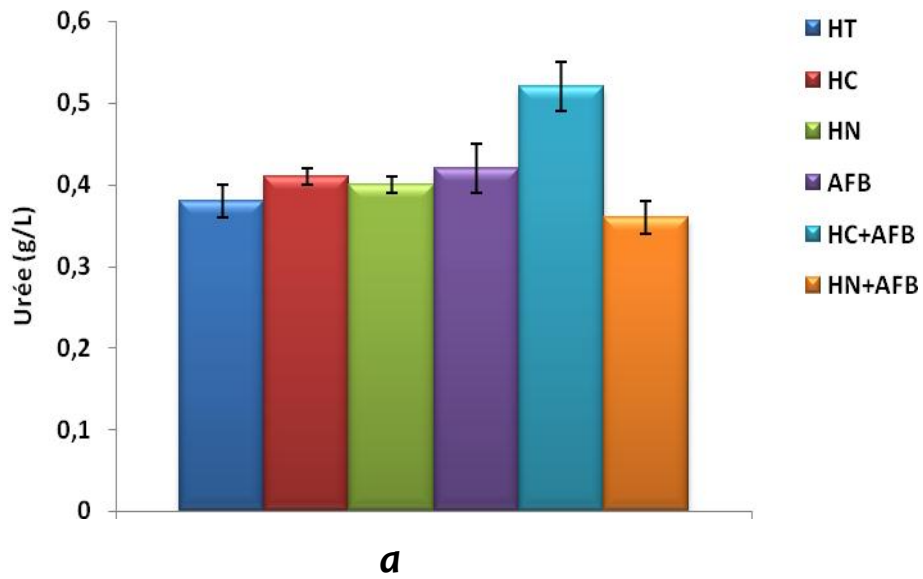


Figure 5.8 Teneurs sériques moyennes de l'urémie (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.
a : Rats intoxiqués par AFB _ **b** : rats intoxiqués par OTA
 Chaque valeur représente la moyenne \pm ES

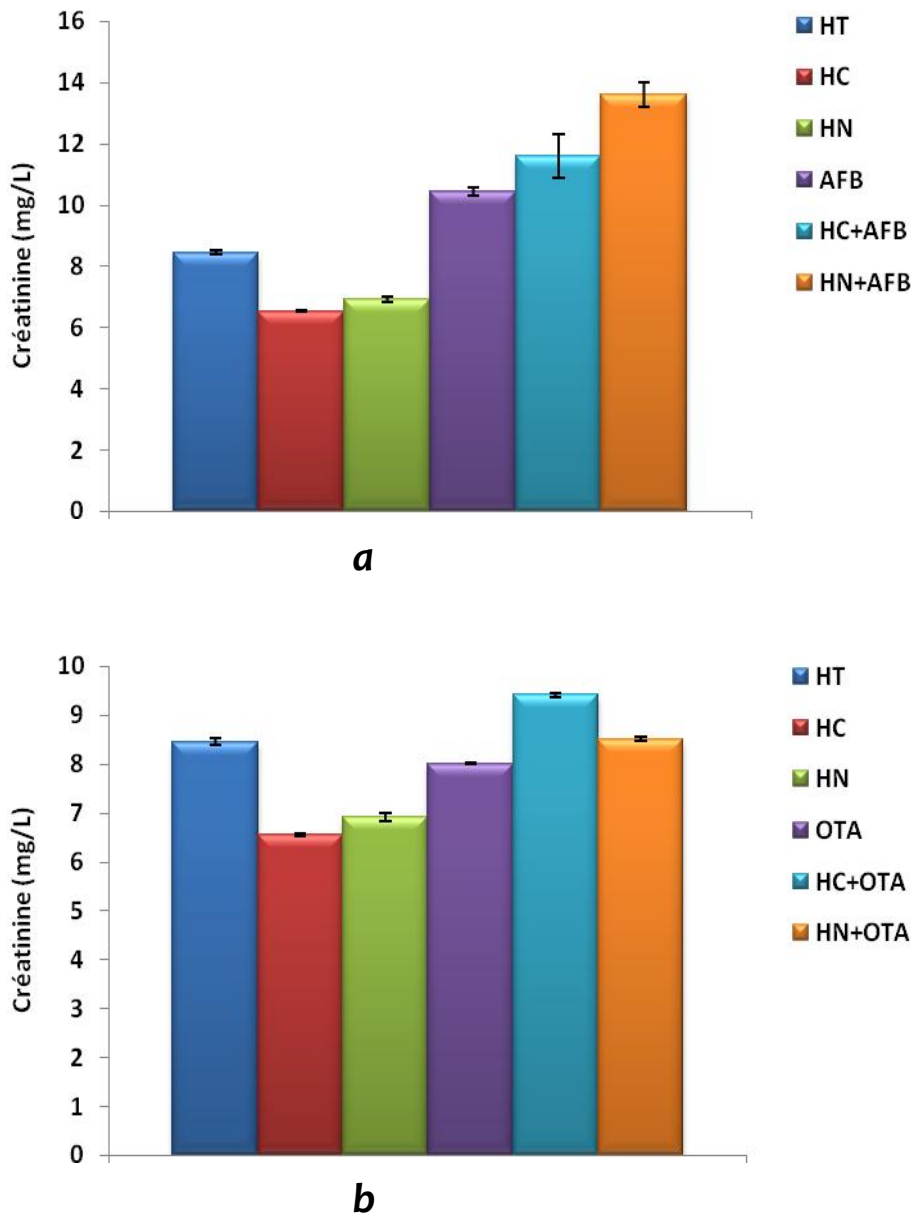


Figure 5.9 Teneurs sériques moyennes de la créatinémie (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.

a : Rats intoxiqués par AFB _ **b** : rats intoxiqués par OTA

Chaque valeur représente la moyenne \pm ES

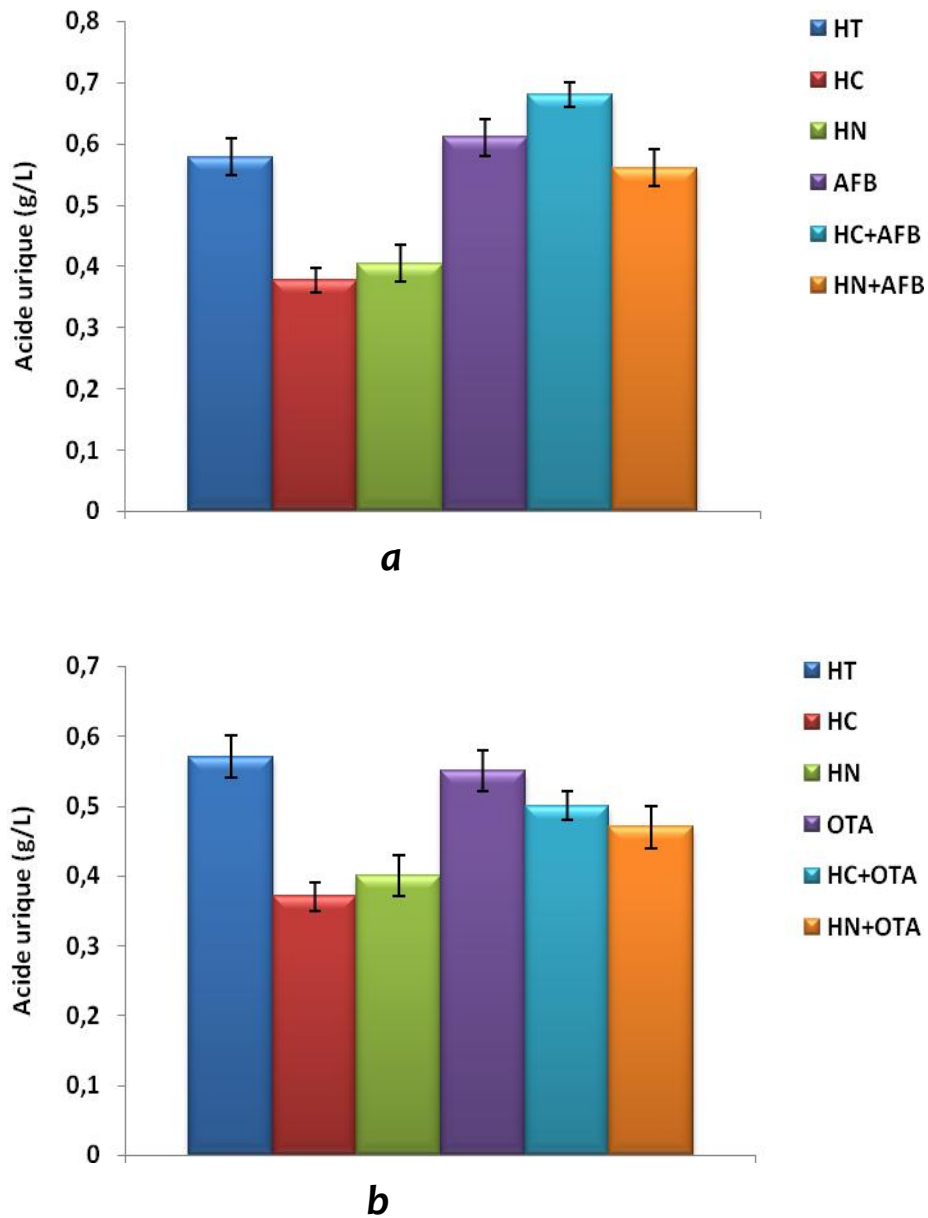


Figure 5.10 Teneurs sériques moyennes de l'acide urique (g/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.
a : Rats intoxiqués par AFB _ **b** : rats intoxiqués par OTA
 Chaque valeur représente la moyenne \pm ES

5.2.5.6 Valeurs moyennes des transaminases (ALAT et ASAT)

Les transaminases sont des enzymes importantes de l'organisme, dont le rôle consiste à transférer un groupe amine lors des nombreux processus chimiques qui se déroulent au niveau hépatique. La localisation de ces hormones est surtout hépatique (dont ils reflètent la fonction de dégradation et d'épuration), mais aussi musculaires notamment le muscle cardiaque qui est le plus riche en ASAT.

L'exploration des teneurs moyennes des ASAT et des ALAT représentées sur les figures 5.11 et 5.12 montre une élévation significative des teneurs moyennes des transaminases chez les lots de rats intoxiqué par les différentes mycotoxines étudiées (AFB ou OTA) par rapport aux lots de rats témoins.

Notons aussi une diminution significative pouvant être assimilée à une correction du taux de ces enzymes chez les lots de rats intoxiqué par AFB ou OTA recevant l'huile de coloquinte ou l'huile de nigelle à 4%.

La lecture des résultats affichés par les différentes figures révèle une diminution significative du taux des ASAT chez les rats intoxiqué par AFB ou OTA recevant un régime supplémenté huile de nigelle à raison de 4% par rapport aux lots de rats intoxiqués.

Le rapport ASAT/ALAT n'est pas modifié en ajoutant l'huile de coloquinte ou l'huile de nigelle par rapport ASAT/ALAT du lot témoin, par contre ce rapport augmente pour atteindre son maximum chez les lots intoxiqués par AFB ou OTA. La cinétique de rapport tend vers une correction en adjuvant l'huile de coloquinte ou l'huile de nigelle ou régimes intoxiqués.

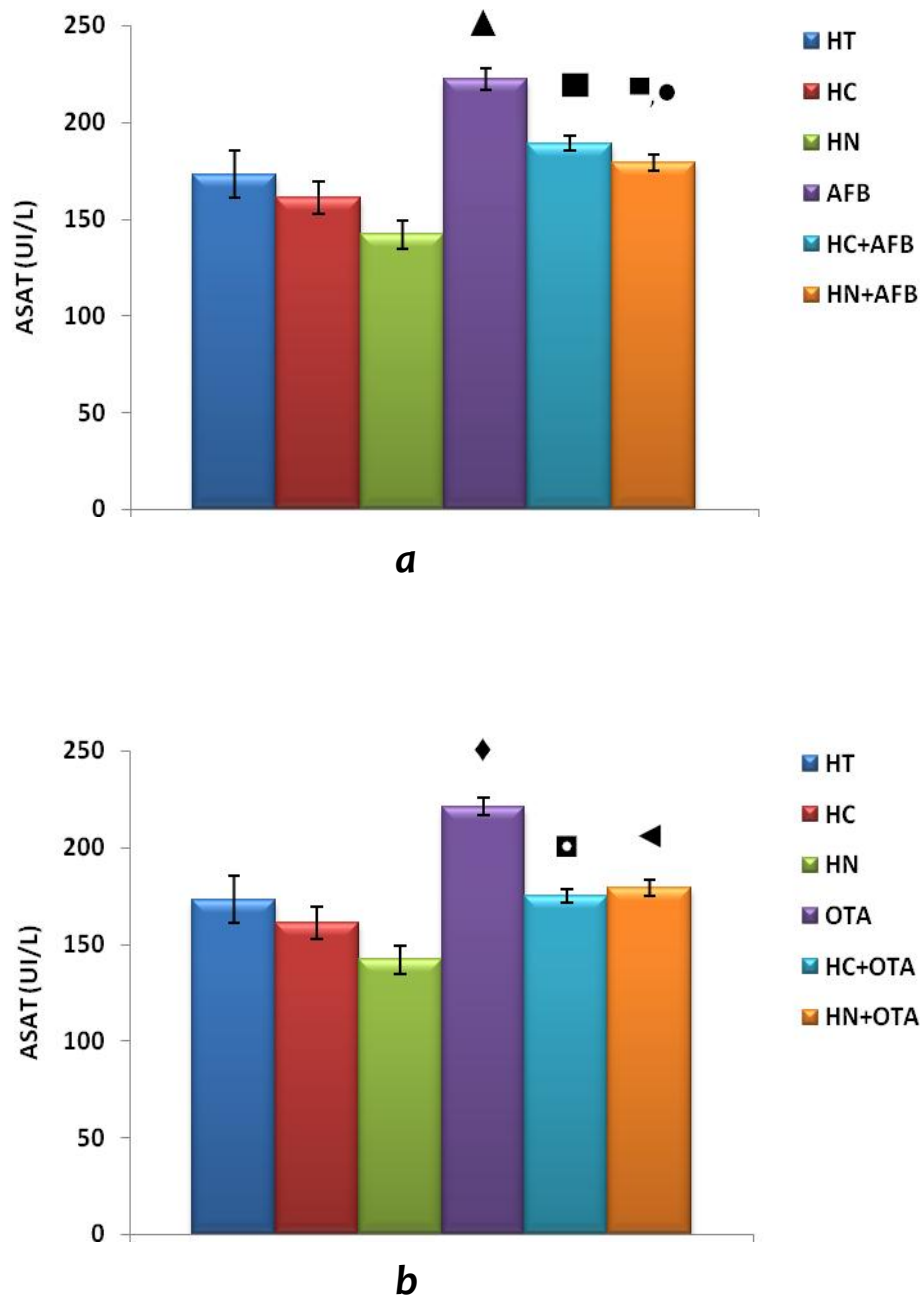


Figure 5.11 Teneurs moyennes des ASAT plasmatiques (UI/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.

a : Rats intoxiqués par AFB _ **b** : rats intoxiqués par OTA

P<0.005 ▲ : différence significative entre AFB et HT

P<0.005 ■ : différence significative entre HC+AFB / AFB

P<0.005 ■, ● : différence significative entre HN+AFB/ AFB

P<0.005 ◆ : différence significative entre OTA et HT

P<0.005 ◻ : différence significative entre HC+OTA/OTA

P<0.005 ◀ : différence significative entre HN+OTA/OTA

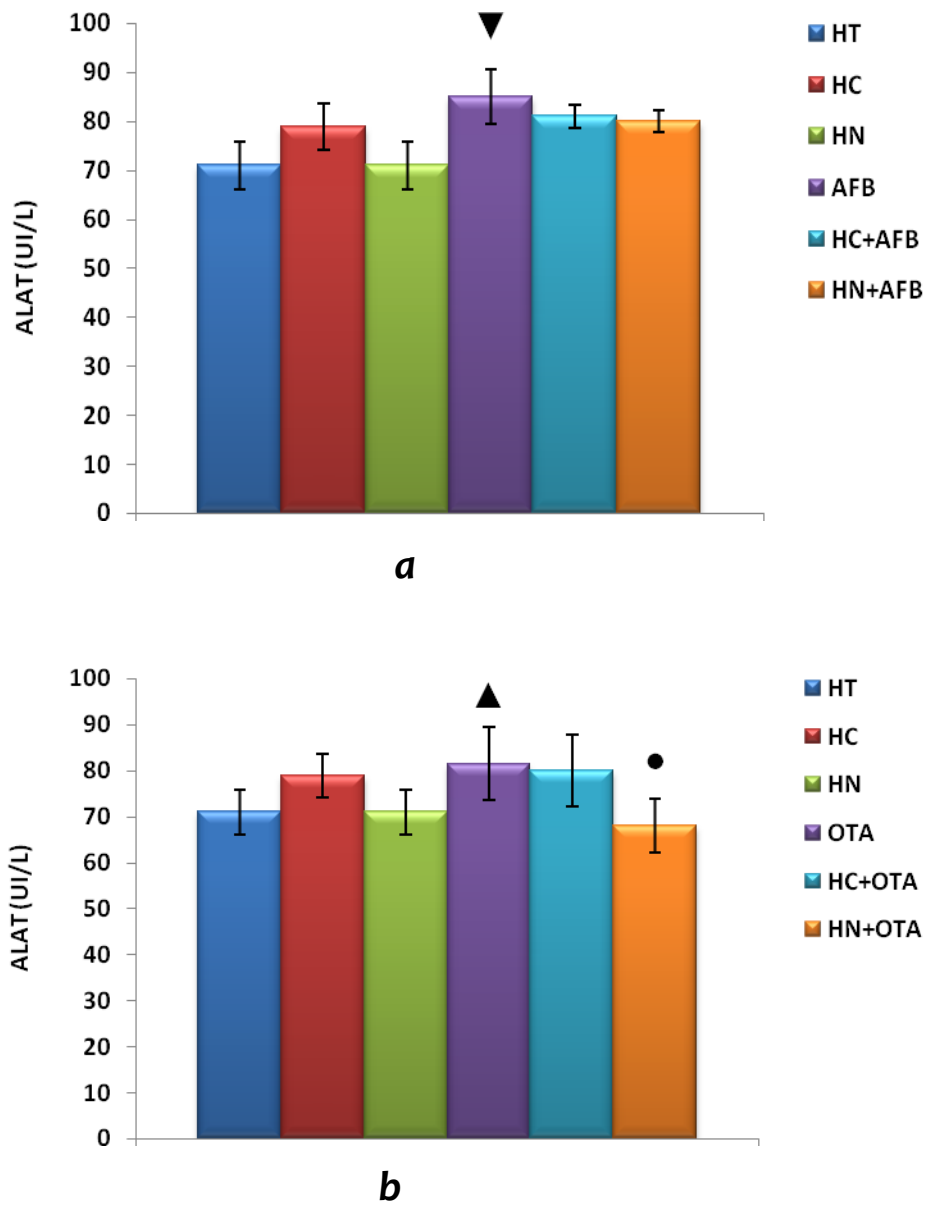


Figure 5.12 Teneurs moyennes des ALAT plasmatiques (UI/L) chez les rats soumis aux différents régimes alimentaires après expérimentation.
a : Rats intoxiqués par AFB _ **b** : rats intoxiqués par OTA
 Chaque valeur représente la moyenne ± ES

P<0.005 ▼ : différence significative entre AFB et HT

P<0.005 ▲ :différence significative entre OTA et HT

P<0.005 ●:différence significative entre HN+OTA/OTA

5.3 Discussion

La contamination des denrées alimentaires destinées à la consommation humaine et animale, ainsi que des produits agricoles par les mycotoxines, continue d'affecter sérieusement la disponibilité et l'innocuité de l'approvisionnement alimentaire (FAO, 2003). Ce problème se présente comme une question d'importance mondiale, tant sur le plan économique que sur le plan de la santé publique. Bien que la situation soit différente entre les pays développés et ceux en voie de développement, plusieurs d'entre eux, ont pris conscience de l'ampleur de la question et accordent une attention grandissante aux problèmes posés par ces mycotoxines (TOZLOVANU, 2008).

Devant ce constat et face à l'émergence d'un sentiment d'insécurité, l'on assiste de plus en plus à la mise en place des stratégies préventives limitant ces contaminations et des traitements industriels visant à décontaminer les denrées alimentaires. Cependant, les procédés alimentaires usuels (cuisson, lyophilisation, congélation) ne peuvent en général au mieux que détruire partiellement la plupart des mycotoxines présentes dans les aliments (SCOTT, 1996 ; BULLERMAN *et al*, 2002 ; PARK, 2002 ; RYU *et al*, 2002).

Dans ce but, de nombreux chercheurs se sont orientés vers des alternatives de réductions ou de lutte contre cette contamination, telle que la lutte naturelle fondée sur l'utilisation des différents extraits des plantes médicinales en vue d'une contribution à leur valorisation, en raison de leurs efficacités, et leurs coût moins élevé par rapport aux autres méthodes de réductions (MEBARKI *et al*, 2010). Les preuves scientifiques déduites à partir des études expérimentales et des essais d'intervention confirment ainsi l'amplitude du spectre d'activité antimicrobienne et antifongique confiné aux huiles des plantes. Partant de ce concept nous avons essayé d'introduire l'huile de coloquinte et l'huile de nigelle dans des régimes alimentaires chez des rats de souche Wistar intoxiqués par l'aflatoxine (AFB₁) et l'ochratoxine A (OTA) en vue d'évaluer l'action thérapeutique ou préventive probable des ces huiles sur la toxicité de ces mycotoxines.

Partant des premières constatations nous avons noté que l'évolution du poids des rats intoxiqués par les mycotoxines en particulier l'aflatoxine B et l'OTA a marqué une diminution par rapport aux rats témoins. Cette perte de poids a été beaucoup plus marquée pour les lots de rats intoxiqués par l'AFB₁ (14.28%) comparativement à la perte de poids engendrée par l'administration de l'OTA (8.58%). Ces résultats sont en accord à ceux obtenus par (GALTIER *et al*, 1974), qui révèlent que l'intoxication du rat par l'AFB₁ ou l'OTA entraîne une altération de la croissance pondérale, la persistance de l'effet toxique et probablement la rémanence de la toxine

dans l'organisme. Ces résultats sont aussi similaires à ceux cités par (**BODIN et al, 1975**), (**HATEY et al, 1977**) et (**MOLINIE, 2004**). En ce concerne les rats intoxiqués par l'AFB₁, **HANAK (2002)** avait démontré l'existence d'un ralentissement de la croissance, voire une toxicose hépatique chez les animaux d'élevage. Aussi l'intoxication aiguë par les aflatoxines peut se manifester par un malaise, une perte de l'appétit puis un ralentissement du gain de poids (**GITA, 2005**).

Par ailleurs un retard de croissance chez les rats Wistar, suite à une exposition à l'OTA via l'alimentation, avait été mis en évidence selon les résultats de (**MUNRO et al, 1974**) pour des doses supérieures à 480µg/kg lors d'un traitement pendant 14 jours. Une étude menée pendant 90 jours sur des rats Wistar, mâles et femelles, a permis d'établir la dose pour laquelle on n'observe aucune réduction du gain de poids à 75µg/kg. Il est à noter que ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par (**CANADAS, 2006**) ou l'analyse des valeurs moyennes, montre que pour les rats femelles, le gain de poids est légèrement supérieur chez les femelles recevant un aliment contaminé en OTA.

La réduction du poids corporel des rats intoxiqué par les différentes mycotoxines étudiées peut être expliquée par la diminution de leur consommation alimentaire ou par manque d'apport alimentaire par anorexie chez ces sujets expérimentaux. Cette diminution peut aussi être la conséquence de la toxicocinétique de ces toxines, à leurs modes d'absorption au niveau intestinal, à la longue demi-vie due à leurs fixation sur des protéines plasmatiques principalement l'albumine. Cette fixation retarde donc le transport de ces toxines vers les différents organes et par conséquent contribuerait au développement de ces effets toxiques chroniques.

En effet les études de (**POHLAND et al, 1992**), (**PFOHL-LESZKOWICZ et al, 2002**) et (**PFOHL-LESZKOWICZ & CASTEGNARO, 1999**) ont montré l'effet délétère des mycotoxines sur différents organes inclus les intestins, ceci peut conduire à une mauvaise rétention des éléments nutritifs au niveau de l'épithélium intestinal et par conséquent une diminution du poids corporel. En plus l'élévation du taux des protéines du sang constaté pour ce lot ainsi que les effets néfastes de ces toxines sur leurs synthèse confirmés par les travaux de **CREPPY (1993)** qui pourrait contribuer à la perte de poids.

D'autre part, les résultats indiquant la diminution du poids chez les rats recevant 4% de l'huile de coloquinte et 4% de l'huile de nigelle comparativement à des rats recevant le régime témoin était en accord avec ceux publié par (**BADIFU & OGUNSUA, 1991**), (**DUKE, 2001**) et (**SEBBAGH et al, 2009**) du fait que ces huiles peuvent contenir des facteurs inhibiteurs de la digestibilité provoquant une diminution de l'absorption intestinale des lipides et la digestibilité protéique

(SEBBAGH *et al*, 2009). En outre, l'acide stéarique qui représente 6.1% (SEBBAGH *et al*, 2007; SEBBAGH *et al*, 2009) des acides gras de l'huile de coloquinte n'est pas absorbé par l'épithélium intestinal à cause de son point de fusion qui est hautement élevé 70°C ; ce qui le rend solide à 37°C (DUBOIS *et al*, 2008).

Les acides gras contenus dans ces huiles sont des éléments structuraux, indispensables à l'entretien des tissus et des organes chez les mammifères. Différentes études ont montré qu'ils peuvent modifier l'homéostasie, la morphologie, l'histologie des cellules et par conséquent les fonctions des organes voire de l'organisme (GIRARD, 2003). Lorsque l'environnement d'une cellule ou d'un tissu est modifié (exigences physiologiques plus importantes, circonstances pathologiques), il existe des possibilités d'adaptation cellulaire et tissulaire, avec un nouvel équilibre : atrophie, hypertrophie, hyperplasie et métaplasie (LAVERGNE & MOSNIER, 2005). La diminution de la masse fonctionnelle d'une cellule est habituellement liée à une diminution de son activité, par contre, une augmentation réversible de la taille d'une cellule est en rapport avec une augmentation de la taille et de nombre de ses constituants (mitochondrie, appareil de Golgi, réticulum endoplasmique...); cette hypertrophie varie habituellement avec l'accroissement des stimuli et l'activité cellulaire (LAVERGNE & MOSNIER, 2005). Ceci a généralement pour conséquence une augmentation de volume de l'organe en entier.

Le deuxième constat de l'analyse de nos résultats révèle que le groupe des toxines fongiques (AFB1/OTA) a présenté les valeurs prééminentes concernant le poids du foie et celui du cerveau. Dans le cas de l'AFB1 l'intoxication aiguë peut provoquer des signes importants de lésions du foie pouvant induire des congestions voir même des hémorragies pouvant être à l'origine d'encéphalopathies et d'œdèmes pouvant entraîner la mort de l'animal sous l'action d'une hépatomégalie au bout de quelques heures voir quelques jours. Dans le cas le plus fréquent d'aflatoxicose chronique, le foie reste la principale cible (GITA, 2005). L'action de l'AFB1 peut prendre d'autres proportions une fois ingérée. En effet l'aflatoxine B1 est dégradée et les substances qui en résultent sont parfois plus toxiques que la mycotoxine ingérée (YIANNIKOURIS & JOUANY, 2002).

Pour ce qui est de l'OTA, une modification du profil de métabolisation des mycotoxines résiduelle peut conduire à favoriser leurs accumulation dans ces organes selon CANADAS (2006), il a aussi mentionné dans ce travail que le schéma de distribution de l'OTA, au bout de quatre semaines d'exposition, pouvait être le suivant: des quantités équivalentes sont retrouvées dans le foie et les poumons, supérieures à celles des reins et celui la est supérieure au poids du cerveau

aussi bien chez les rats femelles que chez les rats mâles, et ce quelle que soit la dose d'exposition à l'OTA. Cette distribution est corroborée par les travaux de **KANE et al (1986)** chez des rats exposés à 144µg d'OTA/kg pc/jour et pendant 12 jours.

La distribution de l'OTA ingérée dépend de son transport dans l'organe et de son élimination. Au niveau du foie, l'élimination de l'OTA va dépendre de son transport vers cet organe de sa métabolisation, de son excrétion biliaire ainsi que son passage vers le sang (**PANG & ROWLAND, 1977 ; PANG & GILLETTE, 1978 ; YAMASAKI et al, 1996 ; SHITARA et al, 2005**). Rappelons que les transporteurs diffèrent au niveau rénal et hépatique (**KUSUHARA & SUGIYAMA, 2002**).

L'augmentation du poids du foie chez les lots (AFB1 et OTA) et les kystes remarqués lors du sacrifice peut être un marqueur tumoral, l'agrandissement distingué au niveau du cerveau de ce dernier est peut être dû à l'accumulation de la toxine au niveau de cet organe. En parallèle, plusieurs études ont montré que les mycotoxines peuvent influencer le bon fonctionnement du système nerveux. Le cerveau est hautement vulnérable à la peroxydation des lipides à cause de leur affinité à l'oxygène (**NEMMICHE et al, 2007**).

Le rein, organe cible de ces mycotoxines en particulier l'OTA avait un poids presque constant chez tous les groupes de rats testés. Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par (**BOORMAN, 1989**) ou des changements sous forme d'une dégénérescence du volume prouvent que le rein était aussi le tissu principal touché avec des changements dégénératifs observés dans les tubules rénaux et les cellules épithéliales.

Par ailleurs plusieurs études ont confirmés que les aflatoxines et les ochratoxines sont clairement néphrotoxiques chez toutes les espèces animales (**CASTEGNARO & PFOHL-LESZKOWICZ, 2001**), chez l'homme elle sont impliquées dans la néphropathie endémique des Balkans (BEN), maladie caractérisée par une tubulonéphrite, une enzymurie et une déficience rénale (**RADONIC & RADOSEVIC, 1992 ; VUKELIC et al, 1992**), de ce fait une analyse biochimique des urines est indispensable comme étant une étape primaire d'un diagnostic néphrologique. Le troisième constat révélé de nos résultats sur le plan des analyses biochimiques des urines des lots expérimentaux et témoins n'a montré aucune différences des paramètres testés de ces derniers, ces résultats se rapprochent à ceux de (**COOK et al, 1986**) exception faite pour le taux des nitrites observé chez les lots intoxiqué par l'AFB1 et l'OTA qui est probablement due à une infection urinaire. Le nitrite peut être indétectable lorsque l'infection est due à une faible concentration de micro-organismes ou à un micro-organisme qui ne produit pas de nitrite tel que *Staphylococcus saprophyticus* (**FRANK BALLY, 2007**). Par contre ces résultats sont en désaccord pour ce qui du

taux de glucose avec ceux de (**HUMPHREYS, 1988**). Notons que ces toxines fongiques peuvent générer une baisse de 25 % de la néoglucogenèse rénale (qui constitue une des voies majeures du métabolisme des glucides au niveau rénal) (**MEISNER & CIMBALA, 1986**). Cet effet provient dans le cas de l'OTA par l'inhibition de la synthèse d'ARN messenger codant pour la phosphoénol pyruvate carboxykinase (PEPCK). Une telle baisse d'activité de cette enzyme a été aussi constatée par (**MEISNER & SELANIK, 1979 ; MEISNER et al, 1983 ; MEISNER & CIMBALA, 1986**). L'AFB₁ et l'OTA peuvent avoir un effet hyperglycémiant, lié d'une part à la stimulation de la glycogénolyse et d'autre part à la formation de glucose à partir d'autres nutriments et notamment d'acides aminés glucoformateurs selon les résultats de (**VERMA & SHALINI, 1998**).

Tout constituant sanguin est la résultante de l'équilibre entre les entrées (apport alimentaire, synthèse, mobilisation des réserves) et les sorties (stockage, catabolisme, élimination). La variation d'une concentration peut donc être interprétée en fonction de ces différentes composantes (**FAUCET, 2005**). Ces concentrations peuvent ainsi être modifiées par la présence des pathologies ou des toxines.

Pour ce qui est de la chimie des urines, le constat afférant aux valeurs moyennes de la glycémie montre un respect de ces valeurs à la norme physiologique requise chez les rats recevant les régimes à base de (HT) et (AFB/OTA), ces résultats sont en accord avec ceux de (**CANADAS, 2006**). Cette stabilité de la glycémie chez ces lots durant le mois d'expérimentation n'indique pas une influence délétère de ces huiles ni de la toxine aux doses usitées (125µg/kg pour AFB₁ et 250µg/kg pour OTA) sur ce paramètre. Beaucoup d'études notamment celle de **FAUCET (2005)** avaient affirmé qu'une dose plus élevée d'OTA pouvait avoir un effet hyperglycémiant, lié d'une part à la stimulation de la glycogénolyse et d'autre part à la formation du glucose à partir de d'autres nutriments et notamment les acides aminés glucoformateurs (**VERMA & SHALINI, 1998**). Une diminution de ce paramètre chez le lot (**HC**) par rapport à celui témoin (**HT**) a été constatée, ce phénomène commence à apparaître dès la dernière semaine de l'étude. Cela pourrait revenir à la durée d'étude (un mois) en comparaison avec les résultats obtenus par (**AMMAMOU et al., 2010**) après deux mois d'expérience.

SEBBAGH et al en (**2009**) sont les premiers à avoir montré que l'utilisation d'huile de coloquinte extraite à partir des graines et incorporée dans les régimes alimentaires a un effet régulateur de la glycémie et/ou préventif des cellules bêta-pancréatiques chez les rats males Wistar rendus diabétiques la streptozotocine (**ABDELHASAN ; ABDELBARRY & MOHAMIDA, 2000**) ont montré également un effet hypoglycémique oral, signifiant et consistant de l'extrait de cette

plante qui peut être attribué à la présence des saponines. Il est bien connu d'après (**AMMAMOU et al., 2010**) que les lipides alimentaires peuvent aussi influencer le métabolisme glucidique ainsi que protéique.

Le travail de (**NMILA, 2002**) a aussi montré que différentes fractions de la graine de coloquinte (*Citrullus colocynthis* L. Schrad.) ont la propriété de stimuler la sécrétion d'insuline et d'augmenter le débit vasculaire pancréatique dans le pancréas isolé du rat. Les acides aminés responsables de l'effet insulino-stimulant peuvent être soit présents chez les mammifères ou spécifiques des plantes. Or la phénylalanine est connue pour avoir une propriété insulino-sécrétrice et pourrait donc être responsable des effets observés. Il faut à cette occasion rappeler qu'un dérivé de la D-phénylalanine (A4166) est un agent hypoglycémiant insulino-stimulant déjà utilisé dans la thérapeutique du diabète de type 2. Aussi, les résultats de l'étude de (**SEBBAGH et al, 2007**) ont illustré que l'huile de coloquinte est bénéfique à l'atténuation des complications et peut être préventive au diabète à cause de ces AG et autres nutriments comme les vitamines liposolubles et les polyphénols. Ces mêmes auteurs ont observé une glycémie plasmatique normale chez les rats Wistar rendus diabétiques après leur administration à cette huile végétale ces portées sont confirmés par l'étude collectif de (**SEBBAGH et al, 2009**) ainsi qu'une étude de **FALLAH (2009)** qui l'a utilisé à une dose de **300 mg/jour** en trois doses fractionnées comme thérapeutique contre le diabète de type 2. Une étude sur des souris réalisée par (**JİYUN et al, 2011**) prouvé que la pastèque a un potentiel bénéfique contre le diabète.

Les transaminases sont des paramètres biochimiques pouvant être utilisées pour évaluer le bon fonctionnement de l'organisme. Ce sont des enzymes indispensables de la néoglucogenèse qui catalysent le transfert d'un groupe amine afin de produire de l'acide oxaloacétique et de l'acide pyruvique (**Buswell & Stalder, 2001**). De même, l'activité de l'ASAT est élevée dans le foie (localisation mitochondriale et cytoplasmique) mais aussi dans le muscle, les érythrocytes, le rein et le pancréas. Une élévation de l'activité sérique de l'ASAT n'est donc pas aussi spécifique d'une lésion hépatocellulaire qu'une élévation de l'ALAT. Elle peut être observée lors d'affection hépatique, de lésion musculaire (traumatisme, injection intramusculaire) ou d'hémolyse (**Bellier, 2010**).

Nos résultats montrent une augmentation significative des concentrations moyennes des ALAT et ASAT chez les rats recevant le régime intoxiqué par l'AFB₁ à 125 µg et/ou l'OTA à 250 µg par rapport aux lots de rats témoins (**HT**). Ces résultats sont en accord a ceux de (**BROSKA et al.,**

2003) et (NEMMICHE *et al.*, 2007). En effet ces auteurs ont signalés une augmentation significative des transaminases chez les lots de rats intoxiqués au cadmium suite a une atteinte hépatique. Nos résultats sont corroborés par les travaux de d'AL-QARAWI (2003) qui a observé une élévation des taux de ces enzymes sous l'effet les extraits de la coloquinte. Par ailleurs l'hépatotoxicité associée à l'administration des doses quotidiennes de l'AFB₁ s'est manifesté par l'augmentation significative des activités des transaminases ASAT et ALAT (GALTIER *et al.*, 1984). Les mêmes résultats ont été observés par ABDELWAHAB *et al* (2002), qui ont montré une augmentation des transaminases. Augmentation corrélée probablement aux changements dans les tissus hépatiques et du système biliaire au cours des traitements avec des mycotoxines en particulier l'AFB₁.

Selon (CANADAS, 2006), la modification des taux de ces enzymes dépend de la dose administrée ainsi que la voie d'administration et peut être expliqué par une insuffisance rénale provoquée par l'ingestion de l'OTA ou bien un changement de conformation ; L'enzyme dans ce cas n'est plus liée à son substrat ou à ses cofacteurs et est ainsi plus exposée aux dégradations cela est en accord avec les travaux de (AUGUSTIN, 2007) sur le chien.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour justifier l'augmentation du taux des transaminases. En effet, les ASAT et les albumines peuvent former un complexe sérique ce qui augmente l'activité sérique de l'ASAT. Cette augmentation peut être due à la formation d'un complexe avec des immunoglobulines voire des plus rarement des lipoprotéines, ainsi qu'une éventuelle agrégation de plusieurs molécules enzymatiques pouvant aussi être la cause de cette élévation (DURANT *et al.*, 2008).

En revanche, cette augmentation semble être contrecarrée par l'adjonction des huiles végétales (HC ou HN), Ou l'on note un début de rééquilibrage du taux de ces transaminases chez les lots de rats intoxiqués par AFB₁ ou OTA. Cette probable stabilisation du taux enzymatique peut être le signe révélateur d'une correction probable du statut enzymatique chez les rats intoxiqués, Il est donc intéressant dans ce contexte d'en savoir plus sur les relations potentielles entre la qualité et la quantité des lipides alimentaires sur les enzymes hépatiques (principalement le rapport AGI/AGMI/AGPI). On suggère que l'aspect qualitatif et quantitatif des lipides alimentaires dans ces huiles pourrait être un facteur modulateur important de l'expression et/ou de l'activité des enzymes hépatiques (BERROUKECH, 2010).

Chez les mammifères, le plasma sanguin contient au moins une centaine de protéines. Sur le plan quantitatif, l'albumine est la protéine la plus abondante (60% des protéines plasmatiques). Au cours de certaines maladies, la concentration des protéines totales et la proportion respectives des différentes fractions peuvent s'écarter de la normale. Seules les variations des protéines les plus abondantes (albumine et immunoglobulines) ont un effet significatif sur la concentration totale. Le dosage des protéines totales plasmatiques est utilisé pour apprécier les fonctionnements hépatique et rénal, le dysfonctionnement du système immunitaire ainsi que pour surveiller les maladies métaboliques et nutritionnelles (**JEANNE-ARMELLE, 2004 ; ESTEPA, 2008**).

L'analyse de nos résultats montre que l'AFB₁ a diminué significativement le taux des protéines totales et d'albumine chez les rats intoxiqué ainsi que les lots de rats recevant les différentes huiles étudiées. Ces résultats peuvent être commentés par le fait que l'AFB₁ est probablement transportée dans le sang par l'albumine, cette dernière est synthétisée par l'hépatocyte et formée d'une chaîne glycosylée de 585 acides aminés avec des groupements thiols (SH) qui sont probablement considérés comme des sites privilégiés pour la fixation de cette toxine, et de ce fait, ces protéines pourraient perdre leurs structures tertiaires, donc leurs propriétés biologiques seront probablement affecté ; De ce fait ces protéines deviendraient plus sensibles aux actions des protéases, des protéasomes et peuvent devenir hydrophobes. Ceci pourrait induire une diminution du taux de l'albumine dans le sang. Ces hypothèses ont été émises par **JEANNE-ARMELLE (2004) et ANDUJAR et al., (2010)**.

Par ailleurs plusieurs auteurs, notamment **PFOHL-LESZKOWICZ (1999)** ont montré la diminution du taux des protéines chez les rats intoxiqués par l'AFB₁. Cette diminution a été corrélée au mécanisme primaire d'action des mycotoxines par le fait qu'elles agissent le plus souvent au niveau de l'ADN, ce qui probablement diminuera la transcription et inhibera la synthèse des protéines. Dans certains cas, ces toxines fongiques pourraient interagir directement avec les enzymes et les coenzymes, les effets se traduiront donc par un changement du métabolisme et de la régulation puis finalement par un effet sur l'organe ou l'organisme en entier (**PFOHL-LESZKOWICZ, 1999**).

Il a aussi été démontré par des études expérimentales chez l'animal que les aflatoxines se fixent sur l'ADN (**EATON & GALLAGHER, 1994**). La présence de ces adduits est à l'origine d'une baisse de la synthèse de l'ADN, la non inhibition de l'ADN polymérase mais aussi parce que l'ADN

modifié ne peut plus servir de modèle, et de ce fait il en résulte un mauvais appariement des bases et donc un blocage de la transcription (MUENCH *et al.*, 1983). Selon YU (1988), cette diminution serait beaucoup plus une conséquence de la formation des adduits à l'ADN qu'une action directe sur l'enzyme, ou une fixation sur les protéines.

Par ailleurs, plusieurs études ont mis en évidence l'importance des effets de ces huiles végétales sur les protéines. En effet, pour ce qui est de l'huile de *Cirtullus colocynthis* L., il est actuellement bien connu que cette huile est fortement linoléique comprenant une majorité en AGPI dont plus de 60% d'AL. Par ailleurs, un excès en AG n-6 pourrait provoquer un état pro-inflammatoire pouvant complexer leurs utilisation en formulation et ce a cause du ratio n-6/n-3, dont la valeur recommandée inférieure à 5 semble être difficile à maintenir (DUBOIS *et al.*, 2008). L'état pro-inflammatoire a stimulé la synthèse des immunoglobulines ce qui influence directement le taux totales des protéines après l'albumine.

Paradoxalement, l'OTA ne semble pas affecter le taux des protéines et de l'albumine, car en effet aucun changement significatif n'a été perçu. Ce constat n'exclut en aucun l'effet de cette toxine sur le foie. Le taux des protéines reste probablement inchangé par le fait d'une hémococoncentration des protéines hypothétiquement due à une maladie métabolique. La présence d'une hyperprotéïnémie peut être due à une déshydratation comme cela se produit au cours de certaines maladies elle peut aussi être due à une lésion au niveau du foie. Le diabète insipide peut être aussi une de ces causes mais aucun syndrome de cette maladie n'est remarqué sur les cinq lots au cours de l'expérience. Il s'avère aussi que l'albuminurie est importante dans le cadre de la progression de la maladie rénale (CHRISTENSEN, 2008).

Les mycotoxines peuvent être capable d'induire plusieurs perturbations du métabolisme lipidique et par conséquent la modification des taux des lipides sanguins totaux inclus les triglycérides et le cholestérol ; Une augmentation des triglycérides indique le plus souvent la présence des pancréatites aiguës, ainsi que l'hypothyroïdie et les syndromes néphrotiques sont à l'origine d'une hypercholestérolémie ; alors que l'hyperthyroïdie, une hépatite sévère, ou une cholestase, pouvant être à l'origine d'une hypocholestérolémie.

Les résultats des triglycérides et du cholestérol rapportent un constat qui affine de plus en plus la problématique traitée, dans cet ordre d'idées nos résultats révèlent une augmentation significative du taux des triglycérides qui est inversement proportionnel au taux du cholestérol pour les lots de rats intoxiqué par l'aflatoxine B1. L'effet de l'OTA est totalement antagoniste, en

effet une diminution du taux des triglycérides à été noté contrastant dans ce cas avec une hypercholestérolémie. Ce constat est similaire à celui obtenu par **(CANADAS, 2006)** au cours d'une étude chez des rats males et femelles nourris par un blé contaminé d'OTA, où la concentration en cholestérol dans le sang des rats femelles est accrue, par rapport à celle des rats males.

Toutefois, les perturbations des marqueurs lipidiques semblent se stabiliser après l'ajout des différentes huiles aux régimes intoxiqués par les différentes mycotoxines. En effet les taux de triglycérides ainsi que les taux du cholestérol semblent être réduits sous l'effet de l'huile de *Citrullus colocynthis* et l'huile de *Nigella sativa*. L'hypothèse émise à ce stade est que, ces huiles sont très riches en composants mineurs, comme les hydrocarbures, principalement les squalènes et les phytostérols ainsi que différents agents antioxydants naturels tels, la vitamine E et la vitamine A, qui en proportion favorable pourront prévenir le vieillissement et les maladies cardiovasculaires **(DELAPLANQUE et al., 2002 ; SEBBAGH et al., 2007 ; SEBBAGH et al., 2009)**. Le même constat a été soulevé par les travaux de **(MERAL et al., 2001 ; EL-SALEH et al., 2004 ; MEZZITI, 2009 ; BURITS et al., 2000 ; DITTA et al., 2003 ; BURIRO et al., 2011)**.

Le profil toxicologique des mycotoxines en particulier ceux étudiés dans notre cas, montre que ces toxines fongiques sont néphrotoxiques et hépatotoxiques et de ce fait peuvent induire une insuffisance rénale chronique. L'investigation du bilan rénal permettra donc de juger de la toxicité des molécules étudiées et de voir l'impact régulateur probable des huiles ajoutées.

En effet le dosage de l'urée permet de en premier lieu de caractériser une insuffisance rénale. L'urée peut être abaissée en cas d'insuffisance hépatique sévère ou en cas de jeun prolongé, il est augmenté en cas d'insuffisance rénale, quelle que soit son origine ; la créatinine, dans l'organisme, provient de la dégradation de la créatine qui est d'une part contenue dans l'alimentation et d'autres part produite par l'organisme, elle est considérée comme étant un très bon marqueur de la fonction rénale **(BERROUKECH, 2010)**.

Par ailleurs, l'interprétation exacte des changements de concentrations plasmatiques nécessite la connaissance des relations existant entre la concentration plasmatique et l'excrétion rénale, cette dernière est réduite par diminution de la filtration ou réduction de la sécrétion tubulaire, et augmentée par une diminution de la réabsorption ou une sécrétion accrue, la mesure de la créatinine et de l'urée dans le sang est le test à utiliser pour une évaluation de base de la fonction rénale.

Le dernier constat et non le moindre est rapporté par l'évaluation des taux de l'urée et de la créatinine qui montre une augmentation du taux total de créatinine chez les rats intoxiqués par les

différentes mycotoxines (AFB₁ ou OTA). Cette augmentation a été détectée même dans les cas d'ajout des différents régimes avec les huiles végétales étudiées dans notre travail.

Ces résultats sont en accord avec ceux de (**CANADAS, 2008 ; ROUVIER, 2004 ; ABDELWAHAB et al., 2002**), ayant indiqué que les traitements en aflatoxines et en ochratoxines entraînaient une augmentation des taux de l'urée. Ces mêmes auteurs indiquent que ces molécules sont dotées d'inducteurs de stress hépatique et rénale. Cette augmentation est probablement due à une atteinte rénale, et une haute hémorragie digestive ou les protéines du sang, après digestion, sont réabsorbées sous forme d'acides aminés dans les parties proximales de l'intestin ce qui fait augmenter le taux de l'urée plasmatique. La concentration de l'urée sanguin est dépendante non seulement de la filtration glomérulaire mais aussi de l'apport en protéines alimentaires, du catabolisme protéique de l'organisme, de la capacité de production du foie et de la perfusion rénale.

Finalement, même s'il n'existe pas actuellement d'étude claire chez l'homme décrivant l'effet de l'aspect qualitatif et quantitatif des lipides alimentaires sur la correction et/ou la prévention contre les effets toxiques des mycotoxines; on a pu conclure à partir de ces résultats que l'intégration de l'huile de coloquinte à 4% et l'huile de nigelle à 4% peut exercer un effet bénéfique sur quelques paramètres biochimiques et l'évolution du poids chez des rats Wistar intoxiqués par l'AFB₁ ou l'OTA en augmentant les performances de défense de l'organisme face à l'intoxication et de même diminué les effets cytotoxiques liés à ces toxines.

Conclusion générale

Plus que jamais, la sécurité alimentaire est au cœur de toutes les préoccupations de l'industrie agroalimentaire et des professions de santé. La contamination fongique des produits d'alimentation humaine et animale constitue actuellement un problème majeur de sécurité sanitaire des aliments.

Conscient de cet état des faits, la pertinence et la nécessité éventuelle de chercher des alternatives de lutter contre les contaminants fongiques incitent de nombreux chercheurs vers l'étude de l'activité antifongique des substances naturelles.

Le but de cette étude était de valoriser la flore locale d'intérêt thérapeutique. A cet effet nous nous sommes intéressés aux huiles extraites des graines de trois plantes médicinales très sollicitées en médecine traditionnelle, en vue d'inhiber *in vitro* une flore fongique toxigène productrice de mycotoxines ; Il a aussi été question d'évaluer *in vivo* l'impact thérapeutique voir régulateur de ces fractions lipidiques sur la toxicité de ces molécules fongiques (Aflatoxine et Ochratoxine).

La première partie de ce travail à été consacrée à la caractérisation des huiles et des esters méthyliques de leurs acides gras aux moyens de détermination physicochimique et différentes techniques d'analyses (étude viscosimétrique, CPG/SM, IR , RMN.¹H, RMN.¹³C). En effet, le profil physicochimique de ces huiles investiguées à été conforme aux normes du codex alimentarius concernant les huiles végétales. L'expertise par les moyens analytiques à démontré la richesse de ces huiles en AGPI. Pour ce qui est des fractions méthyliques d'acides gras (FAME's) extraits des huiles, nous avons déduit de façon formelle la richesse des entités acides gras (acide α -linoléique, linoléique, palmitique et stéarique) de la caractérisation sus citée.

Dans un second temps, nous avons évalué *in vitro* l'activité antifongique des huiles et des FAME's sur une flore fongique toxigène *A.flavus* et *A.ochraceus*, par deux méthodes – évaluation de la croissance radiale sur milieu solide et la quantification de la biomasse sur milieu liquide ; A ce propos, et à la lumière des résultats parvenus par cette étude, on peut conclure que les trois huiles répondent approximativement à la problématique posée. En effet, les huiles ont exercées un retard de croissance sur les champignons étudiés. Ce retard à été plus marqué sur *A.flavus* qu'*A.ochraceus*. Notons que l'ordre d'efficacité décroissant à été huile de *Linum usitatissimum*- *Citrullus colocynthis* et huile de *Nigella sativa*. L'évaluation de l'effet antifongique synergique des huiles à révélé que la combinaison de ces huiles a exercé un effet inhibiteur additionnel surtout en ce qui concerne la combinaison HL/HC/HN de la croissance.

Sur un autre plan, les fractions d'esters méthyliques (FAME's) ce sont révélées eux aussi dotées de pouvoir antifongique sur les propagules fongiques étudiés en particulier *A.flavus*. Ces fractions peuvent donc constituer une alternative bon marché, efficace, avide de toxicité dans le domaine de lutte antimicrobienne ainsi que le domaine clinique.

Par ailleurs, nous devons signaler que la méthode d'évaluation de l'effet antifongique en milieu liquide n'a pas fourni les résultats escomptés et nécessite toutefois une meilleure réflexion pour une utilisation optimale.

Dans un troisième temps, l'étude *in vivo* du pouvoir régulateur des huiles extraites des plantes médicinales a montré que les fractions lipidiques (l'huile de *Citrullus colocynthis* et l'huile de *Nigelle sativa*) ont montré des signes révélateur d'une éventuelle modulation de l'impact des mycotoxines. En effet, ces huiles sont dotées d'effet stabilisateur voir correcteur sur le poids corporel, le métabolisme lipidique et protéique ainsi que l'expression des transaminases.

En conclusion, la valorisation de ces huiles ainsi que leurs fractions d'esters méthyliques permet tout à fait d'envisager une application dans les domaines de lutte antimicrobienne et thérapeutique pour moduler l'impact néfaste des molécules microbiennes toxiques.

En fin, les résultats obtenus ne constituent qu'une première étape de recherche de l'activité antifongique des trois huiles testées, des études ultérieures devront être menés pour affirmer ou infirmer les performances mises en évidence. Un travail important reste à mener concernant l'étude des fractions insaponifiables de ces huiles. Il est conseillé de multiplier les recherches *in vivo* par des études histologiques, de réaliser des études sur culture cellulaire pour mieux affiner l'effet des ces huiles et de leurs fractions.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- AFNOR, 1988. Corps gras , grains oléagineuses, produits derives, Recueil de norme francaise
- Abdel-Fattah A. M., Matsumoto K., Watanabe H. 2000. Antinociceptive effects of *Nigella sativa* oil and its major component, thymoquinone, in mice. *European journal of pharmacology*. 400: 89-97.
- Abdel-Hassan, I.A., Abdel-Barry, J.A. (2000). The hypoglycaemic and antihyperglycaemic effect of *Citrullus colocynthis* fruit aqueous extract in normal and alloxan diabetic rabbits. *Iraq. Journal of Ethnopharmacology*. 71. (pp 325–330). Elsevier.
- Abdel-Wahhab, M.A., et Aly, S.E. (2005). Antioxidant property of *Nigella sativa* (black cumin) and *Syzygium aromaticum* (clove) in rats during aflatoxicosis. *Egypt. Journal of applied toxicology. J. Appl. Toxicol.* 25: 218–223.
- Abecassis, J. (1991). Blé dur, moyens d'appréciations. Dans. *Les industries de première transformation des céréales*. Paris : tec et doc- Lavoisier, p.363-366.
- Aboutabl, E.A., El-Azzouny, A. A; and Hammerschimdt, F.J .1986. Aroma volatiles of *Nigella Sativa* L. seed. *Progress in Essential oil research*. Berlin .p. 49-55.
- Abu naser, A.M., Potts, W.M. (1953). The Analysis and Characterization of the Oil from the Seed of *Citrullus colocynthis*. *Journal of the American oil chemists society*. P. 118-120.
- Adrian, J., Potus, J., Poiffait, A., Dauvillier, P.1998. *Introduction à l'analyse nutritionnelle des denrées alimentaires Tec & Doc, Paris*, p :254.
- Acia (1994) ; *La biologie du Linum usitatissimum L.(lin)*. Canada .P 4-6.
- Agrawal, R., Kharya, M.D, Shrivastava, R. (1979). Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. *Indian J Exp Biol*. Vol.17.P.1264-1265.
- Akhtar, N., Alakloby, O.M., Aljabre.S.H., Alqurashi, A.R., Randhawa, M.A. (2007). Comparison of Antifungal Activity of Thymoquinone and Amphotericin B Against *Fusarium solani* in-vitro. *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)* .Vol. 8. (2).P.173-145.
- Akpambang, V., Amoo, I.A., Izuagie, A.A. (2008). Comparative compositional analysis on two varieties of melon (*Colocynthis Citrullus and Cucumeropsis edulis*) and a variety of almond (*Prunus amygdalus*). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*. 4 (6). P. 639-642.
- Akram, K. (1999). Chemical composition and medicinal properties of *Nigella sativa* Linn. *Inflammopharmacology*. 7 (1). P. 15-35.
- AL-Beitawi, N.A., EL-Ghousein, S.S., Nofal, A.H. (2009). Replacing bacitracin methylene disalicylate by crushed *Nigella sativa* seeds in broiler rations and its effects on growth, blood constituents and immunity. *Livestock Science*. Vol.125.P.304–307.
- Allouche J (2003). Development of new methods for the elaboration of multiple emulsions Water / Oil / Water., Ph.D. Thesis, University of Lausanne pp. 12-18.
- Al-Jabre, S., Al-Akloby, O-M., Al-Qurashi, A-R., Akhtar, N., et al. (2005). Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, inhibited *Aspergillus niger*. *Pakistan Journal of Medical Research*. 42 (3).P.102-104
- Ali, B.H., et Blunden, G. (2003). Pharmacological and Toxicological Properties Of *Nigella sativa*. *Phytotherapy research*. Vol.17. P.299–305.
- Al-Ghaithi, F., El-Ridi, R. M., Adeghate, E., et al. (2004). Biochemical effects of *Citrullus colocynthis* in normal and diabetic rats. *Molecular and Cellular Biochemistry*. (pp 1–7). N° 5266047. Kluwer Academic Publishers.
- AL-Qarawi, A.A., et Adam, S. E. I. (2003). Effect of Combination of *Capsicum frutescens* and *Citrullus colocynthis* on Growth, Haematological and Pathophysiological Parameters of Rats. *Saudia Arabia . PHYTOTHERAPY RESEARCH. Phytother. Res.* (pp 92–95). 17, John Wiley & Sons, Ltd.

- Al-Saleh, I., et al. (2005) Levels of selenium, DL- α -tocopherol, DL- γ -tocopherol, all-trans-retinol, thymoquinone and thymol in different brands of *Nigella sativa* seeds. Saudi Arabia. Elsevier.(pp 167-175)
- Altana, M.F., et al. (2007). Combination therapy of *Nigella sativa* and human parathyroid hormone on bone mass, biomechanical behavior and structure in streptozotocin-induced diabetic rats. Turkey. Elsevier. (pp304-314)
- Amar Belbachir, L. (2007). Contribution a une analyse physicochimique, microbiologique et mycotoxilogique des olives et de l'huile d'olive commercialisé dans la région de Tlemcen et recherche de l'aflatoxine b₁ par les techniques chromatographiques.Thèse de magistère. Inédite, université de Béchar. Algérie.
- Amrouche, A. (2007). Étude mycologique et mycotoxilogique comparative sur le blé tendre local et importé stocké dans la région de Bechar et ces dérivés de meunerie (farines et sons). Thèse de magistère. Inédite, université de Béchar. Algérie.
- Ammamou F. 2010. Effet de l'huile de coloquinte sur l'évolution pondérale et le profil lipidique chez le rat Wistar en croissance ayant reçu un régime hyper-gras. Mémoire en vue de l'obtention de diplôme de magistère en biologie. Université d'Abou Bakr Belkaid. Tlemcen. p 14-41.
- Appelbaum, M., Forrat, C., Nillus, P. (1989).Abrégé de diététique et de nutrition 2e édition Paris, Masson. (pp 473).
- Arici, M., Osman, S., Umit, G. (2005). Antibacterial effect of Turkish black cumin (*Nigella sativa* L.) oils. *Grasas y Aceites Journal*. Vol. 56.P.259-262.
- Ataoui, A. (2006). Approche de la mycotoxinogense chez *Aspergillus ochraceus* et *aspergillus carbunarius*: études moléculaire et physiologiques. Thèse de doctorat. Inédite, École doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques. Toulouse.
- Atta, M.B. (2003). Some characteristics of nigella (*Nigella sativa* L.) seed cultivated in Egypt and its lipid profile. *Food Chemistry* .Vol. 83. P.63–68.
- Augustin M. R. 2007. Pharmacocinétique d'enzymes hépatiques chez le chien. Thèse pour obtenir le grade de docteur vétérinaire. École nationale vétérinaire de Toulouse, France. P 60-61.
- Ave-Sina. (1990). Law in Medecin (Sharafkhandy, A(interpreter)) Ministry of Guidance Publication, Theran,P.314
- Azemar, B. (2000), Etude du rôle de l'ochratoxine A, une mycotoxine alimentaire, dans l'induction des cancers des voies urinaires chez l'homme. Mécanismes moléculaires impliqués. thèse de l'Institut National Polytechnique de Toulouse 244p.
- Badifu; Ogunsua.1991. Chemical composition of kernels from some species of cucurbitaceae grown in Nigeriz. *Plant foods Human Nutr.* 41: 34-44.
- Barnett, H.L. (1972). *Illustred general of imperfection fungi*. Burgess publishing company. Minnesota (USA): 3^{eme} edition.
- Barth, A., Müller,D., Dürrling, K. (2002). In vitro investigation of a standardized dried extract of *Citrullus colocynthis* on liver toxicity in adult rats. Germany. *Exp Toxic Pathol* 2002; 54. (p 223–230). *Journal of URBAN & FISCHER*.
- Baudrimont, I., Murn, M., Betbeder, A.M., Guilcher, J., and Creppy, E.E., (1995), Effect of piroxicam on the nephrotoxicity induced by ochratoxin A in rats, *Toxicology*, 95, &47-154.
- Bejaoui,H. (2007). Champignons ochratoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) dans des vignobles Français et procédés biologiques de décontamination de l'OTA dans les moûts de raisin. Thèse de doctorat. Inédite, institut national polytechnique, Ecole Nationale Supérieure Agronomique. Toulouse.
- Belkacem, N. (2008). Les mycotoxines : production et voie de biosynthèse .Thèse de magister. Inédite, Institue nationale polytechnique. Toulouse.
- Bellier S. 2010. Interprétation et valeurs usuelles des paramètres sanguins en biochimie clinique vétérinaire .Revue francophone des laboratoires. Elsevier Masson SAS. MARS 2010 - N°420

- Belouad, A. (2001). Plantes Médicinales D'Algérie.(pp128-144).office des publication universitaires, 1 place centrale de ben-aknoun (Alger).N°d'édition :2.01.4267.département de botanique a l'institut nationale agronomique d'el-harach-alger.
- Belsem, M., Marzouk, Z.,Décor, R.,Edziri, H. et al. (2009). Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. Journal of Ethnopharmacology. Vol.125. P.344–349.
- Belyaougoubi, L. (2006). Effet de quelques essences végétales sur la croissance des moisissures de détérioration des céréales. Thèse de Magistère. Inédite. université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen.
- Benhammou, N., Atik bekkara, Fawzia. (2006). Contribution à l'étude du pouvoir antifongique de l'huile essentielle d'*Inula viscosa*. Laboratoire de produits naturels, Département de Biologie, Université Abou Bekr Belkaid. Tlemcen. pp 06-09.
- Benmansour k, Medjahed K, Tennouga L, Mansri A (2003). Ionic conductivity of poly[N (3,6,9 trioxadecacyl)-4-vinylpyridinium)] salts with univalent counter-ions in aqueous solution. Polymer 39:1443-1449.
- Bennett, J.W., Klich M.A. (2003). Mycotoxins. Clinical Microbiology Reviews. 16 (3).P. 497–516.
- Berkelaar, D. (2005).Les aflatoxines — un problème sérieux .ECHO Development Notes. avril 2005. N°87.P.1-10.
- Berthier, J., Valla, G. (1998). Moisissures –mycotoxines et aliments : du risque à la prévention. p.16-28.
- Berroukech F. 2010. Effet de l'huile de coloquinte sur l'évolution pondérale et quelques paramètres biochimiques et hématologiques chez le rat male Wistar intoxiqué par le chlorure de cadmium (CdCl₂). Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de master en biologie et sante. Université Abou Bekr Belkaid, Tlemcen. P 30-39.
- Binder, Eva M. (2006). Manging the risk of mycotoxins in modern feed production. Autriche : ELSEVIER.
- Blanc P., Goma G. Valorisations non alimentaires de productions agricoles par voie biologique. In : COLONNA P. La chimie verte. Lavoisier, (2006) : 79-98.
- Bodin G ;Galthier P ; Moré J.1975. Toxine d'*Aspergillus ochraceus* : toxicité de l'ochratoxine A par administration orale prolongés chez le rat. P 207-218.
- Boorman, G. 1989. Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A. U.S.National institutes of health publication 89-2813, Washington.
- Boskabady, M., Mohsenpoor, N., et Takaloo, L. (2010). Antiasthmatic effect of *Nigella sativa* in airways of asthmatic patients. Iran. Elsevier. (pp1-7)
- Botineau, P., Marion, R., Batoulle, S.J. (2008). Les aflatoxines. Travaux personnels de Mycologie.
- Botton B, Bretton A, Fevre H, Gauthier S, Guy Ph, Larpen J P, REYMOND P, Sanglier J, Vayssier T & Veau P. 1990. Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. 2 eme Ed. MASSON. Paris. p.512.
- Bourais, I.,Amine, A. (2006). Aflatoxines toxiques redoutables dans nos aliments. Revue. Les technologies de laboratoire.P.4-8.
- Brochard, G., Le Bacle C. (2009). Les mycotoxines dans le milieu de travail. Document pour le Médecin du Travail (N° 119). Département Etudes et assistance médicale, INRS.P.299-323.
- Brochard, G., Le Bacle C. (2010). Les mycotoxines dans le milieu de travail. Document pour le Médecin du Travail (N° 121). Département Etudes et assistance médicale, INRS.P.33-62.
- Brochard Gita, P. (2005).Mycotoxines en milieu de travail. Thèse de doctorat. Inédite, université Rene descartes. Paris.
- Botton, B., Bretton, A., Fevre, H., Gauthier, S., et al. (1990). Moisissures utiles et nuisibles : Importance industrielle. Paris : 2^{eme} Ed. MASSON. p.512.
- Boublenza. I.(2011). Contribution à l'étude de l'analyse de l'huile de *Citrullus colocynthis* ((Coloquinte)) et de son pouvoir antimicrobien . Thèse de magistère. Inédite, université de Tlemcen . Algérie.
- Buisson, Y., Marié, J.-L., et Davoust, B. (2008). Ces maladies infectieuses importées par les aliments. Bull Soc Pathol Exot.2008. Vol .101 (4). P. 343-347.

- Bullerman L; Ryu D., Jackson L. 2002. Stability of fumonisins in food processing. *Adv Exp Med Biol*: 195-204.
- Buriro D; Tayyab M .2011. *Nigella sativa* (Kalonji): effets on serum cholesterol of albino rats. Lahore.
- Burits M., Bucar F. 2000. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytotherapy research*. 14: 323-328.
- Buswell L, Stalder H . 2001. Elevation des transaminases (Aminopeptidases). *Postgrad Med*. 107:1266-1271.
- Canadas D.2006. Evaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition subchronique à l'ochratoxine A sont-ils atténués?. Thèse pour l'obtention du diplôme de docteur en Génie des procédés environnement. l'institut national polytechnique de Toulouse, France. p : 185-186
- Canet, C. (1999).réglementation mondiale. Dans. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section de l'alimentation et de nutrition. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Chapitre XVI. Quatrième Partie : gestion du risque. (pp. 409-427). Lavoisier, France : Technique & Documentation.
- Carolina H.Pohl, Johan L.F. KOCK and Vuyisile S. Thibane. antifungal free fatty acids: A Review.science against microbial pathogens.61-73. 2011.
- Castagnero, M. (1999). Risques cancérigènes. Dans. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section de l'alimentation et de nutrition. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Chapitre V. deuxième Partie : nature de risque. (pp. 121-134). Lavoisier, France : Technique & Documentation.
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A. (1999). Les aflatoxines. Dans. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section de l'alimentation et de nutrition. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Chapitre VIII. Troisième Partie : évaluation de risque. (pp. 199-228). Lavoisier, France : Technique & Documentation.
- Castegnaro M., Pfohl-Leszkowicz A.(2002). Mycotoxines contaminants omniprésents dans l'alimentation animal et humaine.In : Manfred Moll et Nicole Moll. Sécurité alimentaire du consommateur. Partie XVII. 2^{ème} ed. Paris. Tec et doc.Lavoisier. P. 127-162.
- Chabasse, D., Bouchara, J.P., De gentille, L., Brun, S., et al. (Mars 2002). Les moisissures d'intérêt médical. Cahier de formation biologie médicale. Bioforma. N°25.
- Charmley, L.L; Trenholm, H.L. (2009). Fiche de renseignements - Les mycotoxines. Agence canadienne d'inspection des aliments.
- Chebaibi, A ., Rhazi Filali, F., Lahlou Amine, I., et al. (2007). Etude de l'activité antimicrobienne des feuilles de l'olivier (*Olea europaea* L.). Journée Scientifique « Ressources Naturelles et Antibiothérapie», Faculté des Sciences – Kenitra. Maroc.
- Cheikh-Rouhou, S.,Besbes,S.,Hentati,B.,Blecker, C., et al. (2007). *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry*. Vol.101.P.673–681.
- Cheftel J. C., Cheftel H., 1984. Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Techniques & documentation- Lavoisier : Vol 1 : 244-249.
- Chernozemsky, I. N., Stoyanov, I. S., Petkova-Bocharova, T. K., Nicolov, I. G., Draganov, I. V., Stoichev, I. I., Tanchev, Y., Naidenov, D., and Kalcheva, N. D., (1977), Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in vratza district, Bulgaria. *International Journal Of Cancer*.Journal International Du Cancer 19, 1-11.
- Chevalier, J. (2009). Des parois de levure pour lutter contre les mycotoxines chez le porc. Laboratoire de Pharmacologie-toxicologie. INRA. Toulouse.
- Christensen E. I. 2008. Réabsorption rénale tubulaire de l'albumine en physiologie et en pathologie. Université d'Aarhus. Flammarion médecine-sciences. Danemark.P2-4
- Clinlab. 2000. Évaluation de la fonction rénale chez l'adulte.
- Clinquart, A. (Octobre 2004). Mycotoxines dans l'alimentation. Pôle Technologique Agro-alimentaire. Newsletter n° 3.

- Coskuner, Y., et Karababa, E. (2006). Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). Department of Food Engineering, Faculty of Engineering, University of Mersin. Turkey. Elsevier. (pp 1067- 1073)
- Creppy E.E. 1993. Ochratoxicose humaine en Algérie. In: Creppy, E.E., Castegnaro, M., Dirheimer, G. (Eds.), Human ochratoxycosis and its pathologies. INSERM/John Libbey Eurotext, Montrouge, France, pp. 123–127.
- Cook W.O., Osweiler G.D., Anderson T.D. & RICHARD J.L. 1986.-Ochratoxycosis in Iowa swine. - Journal of the american veterinary medical association. Vol 188, N°12, 1399- 1402.
- Cunnane, S. C, Ganguli, S., Menard, C., Liede, A.C., hamadeh, M.J., & chen, Z.Y.1993. High alpha-linolenic acid flaxseed (*Linum usitatissimum*): some nutritional properties in humans. British Journal of nutrition, 69 (2), P.443-453.
- Dale, W., Raynor, L., Mitchell, A., Walker, R., Walker, K. (2004). Antifungal Activities of Four Fatty Acids against Plant Pathogenic Fungi. *Mycopathologia* revue. 157 (1). 87-90.
- Dane, F., Liu, J., Zhang, C. (2005). Phylogeography of the bitter apple, *Citrullus colocynthis*. Auburn University. Springer. USA.
- De Lucca, A.J., Cleveland, T.E., Wedge, D.E. (2005). Plant-derived antifungal proteins and peptides. Can. J. Microbiol. Vol.51. NRC Research .Canada.
- Djermoun, A. (2009). La production céréalière en Algérie : les principales caractéristiques. Revue. Nature et Technologie. N°1.P.45-53.
- Diedrichsen, A. (2001). comparison of genitic diversity of flax (*linum usitatissimum* L) between Canadian cultivars and a world collection. plant breeding. Vol.120.P. 360-362.
- Diederichsen, A., et Yong, B. (2004). Phenotypic and molecular (RAPD) differentiation of four infraspecific groups of cultivated flax (*Linum usitatissimum* L. subsp. *usitatissimum*). Plant Gene Resources of Canada, Saskatoon Research Centre, Agri-culture and Agri-Food. Canada. 53: 77–90
- Ditta A; Tayyab M; Abdul sattar.2003. Estimation of serum lipids in albino rats feed on palm oil and atheogenic diet and nigella sativa. .lahore
- Dhandhukia, P.C., Thakkar, V.R. (2007). Standardization of growth and fermentation criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for production of jasmonic Acid. African Journal of Biotechnology Vol. 6 (6), P. 707-712.
- Dohou, N., Yamni, k., Badoc, A., et Douira, A. (2004). Activité antifongique d'extraits de thymelaea lythroides sur trois champignons pathogènes du riz. Maroc. bull. soc. pharm. Bordeaux.VOL.143.P. 31-38.
- Doré, T; Fourbet, J.F. (2007).La limitation de la teneur en mycotoxines : les itinéraires techniques, le choix des variétés et l'amélioration génétique des espaces végétales. Académie d'Agriculture de France.
- Dragacci, S., Grosso, F., Fremy, J. (2005). Analyse et détection des mycotoxines. Revue. Techniques de l'Ingénieur. Editions TI Sciences et Techniques, P. 3330.
- Dubois V ; Breton S ; Linder M ; Fanni, J ; Parmentier, M .2008. Proposition de classement des sources végétales d'acides gras en fonction de leur profil nutritionnel. Fondamental.10:1684.
- Duke J. A ., Duke P. A. K. et Cellier J. L. 2008. Duke's handbook of Medicinal plants of the bible.CRC Press: 115.
- Duke J .2001. Chemicals in: *Citrullus colocynthis* (cucurbitaceae). Colocynth. In phytochemical database. USDA-ARS-NGRL, Beltsville Agricultural research. 7(12): 40-51.
- Duris, D. (2000). Coffee and Ochratoxin Contamination. Food Safety Management in Developing Countries. (CIRAD-CP). 34398 Montpellier Cedex 5. France.
- El-Alfy ; T.S, El-Fataty, H.M., Tooma, M.A.1975. Isolation and structure assignment of an antimicrobial principle from the volatile oil of *Nigella sativa* L.Seeds. Pharmaeie 30,P. 109-111
- El -Dakhakny,M., Mady,NI., Halim, MA.2000. *Negella sativa* .oil protect against induced hepatotoxicity and improves serum lipid profile in rats. Arzneiittel-Forschung 50,832-836.

- El khoury, A. (2007). Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Thèse de doctorat. Inédite, École doctorale Sciences et Santé. Toulouse.
- El-Nagdy, G.A, Dalia M.A.Nassar, Eman A. El-Kady, Gelan S.A. El-Yamane. (2010) . Response of Flax Plant (*Linum usitatissimum* L.) to Treatments with Mineral and Bio-Fertilizers from Nitrogen and Phosphorus. *Journal of American Science*. Pp . 207.
- El-Nezami, H., Kankaanpää, P., Salminen, S., Ahokas, J. (1998). Ability of dairy strains of lactic acid bacteria to bind a common food carcinogen, aflatoxin B1. *Food and Chemistry Toxicology*. Vol.36 (4). P. 321-326.
- El-Saleh S.C., Al-Sagair O.A., Al-Khalaf M.I. 2004. Thymoquinone and Nigella sativa oil protection against methionine-induced hyperhomocysteinemia in rats. *International journal of cardiology*. 93: 19-23.
- Encarta. Encyclopédie. 2009. carte géographique de la wilaya de Bechar.
- Estépa L. 2008. Protéines totales. *Biologie clinique* [90-10-0790].
- Fangeat, L. (2008). Les mycotoxines chez les bovins. Thèse de doctorat inédite, université de Claude-Bernard. Lyon.
- FAO. (2001). Manuel sur l'application du Système de l'analyse des risques - points critiques pour leur maîtrise (HACCP) pour la prévention et le contrôle des mycotoxines. Étude Alimentation et Nutrition. N°73.
- FAO, (2003). Réglementations relatives aux mycotoxines dans les produits d'alimentation humaine et animale, à l'échelle mondiale en 2003. N°81.
- Fallah Huseini H., Darvishzadeh F., Heshmat R., Jafari azar Z., Raza M et Larijani B. 2009. The Clinical Investigation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad Fruit in Treatment of Type II
- Faucet M. 2005. L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérigène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de post-marquage de l'ADN au ³²P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A. Thèse de doctorat. Inédite, Ecole Doctorale Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques Bioingénieries. Toulouse.
- Feinbrun-Dothan N., 1978. *Humanities*. Jerusalem.
- Flory PJ (1971). *Principles of polymer chemistry*, Ithaca New York Cornell University press pp. 399-425
- Diabetic Patients: A Randomized, Double Blind, Placebo-controlled Clinical Trial. *Phytotherapy research*. *Phytother. Res*: 23, 1186–1189.
- Fortier, M.P, Turgeon, M.J. (2008). Les mycotoxines dans l'alimentation porcine, un problème important. Centre de développement du porc du Québec.
- Frayssinet, C., Fremy, J-M. (1999). Dosages des mycotoxines. Dans. *Techniques d'analyses et de contrôle dans les industries agroalimentaires*. Chapitre 15. 2ème édition. Lavoisier. Tec. Doc.Paris. p.349-370.
- Galindo, S. (2008). Les mycotoxines état des connaissances, réglementation. Le risque mycotoxine.
- Gallot, J. (février 2002). Mycotoxines : un risque à maîtriser. *Actualité CCRF*. France. N°151. P.1-3.
- Galtier, P., Loiseau, N., Oswald, I.P., Puel, O. (2006). Toxicologie des mycotoxines : dangers et risques en alimentation humaine et animale. *Bull. Acad. Vét. France* .Tome159. N°1. P. 5-13.
- Galtier, P., Oswald, I., Leblanc, J.C., Le bizet, B., et al. (2009). Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale. Rapport final.France. Afssa. P. 8-261.
- Gatel, F., Ruch, O., et Hebrard, JP. (Avril 2004). Dossier mycotoxines : Avancées des connaissances et réglementation. *Perspectives agricoles*.N°300. P.23-35.
- Gautier, J., Richoz, J., Welti, D. H., Markovic, J., Gremaud, E., Guengerich, F. P., and Turesky, R. J., (2001a), Metabolism of ochratoxin A : absence of formation of genotoxic derivatives by human and rat enzymes. *Chemical Research*, In : *Toxicology* 14, 34-45.

- Ghedira, K., La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). Laboratoire de pharmacognosie, faculté de pharmacie de Monastir, Tunisie. *Phytothérapie* (2006) Numéro 5:220-226. Springer.
- Girard J. 2003. Acides gras, insulinosécrétion et lipotoxicité. *Med Ther Endocrinol.* 12: 29- 36.
- Giwa S., Abdullah L.C., Adam N. M. 2010. Investigating «Egusi» (*Citrullus colocynthis* L.) Seed Oil as Potential Biodiesel Feedstock. *Energies*; 3; doi: 10.3390/en 3040607: 607-618.
- Grosse Y., Chekir-Ghedira, L., Huc, A., Obrecht-Pflumio, S., Dirheimer, G., Bacha, H., and pfohl eszkowicz, A., (1997a) Retinol (vitamin A), ascorbic acid (vitamin C) and a tocophérol (vitamin E) prevent DNA adduct formation in mice pretreated with ochratoxin A and Zearalenone, *Cancer letters* 114, 225-229.
- Guignard J.L. 2001 . *Botanique systématique moléculaire*. 12ème Edition Masson (Paris), P: 304.
- Guillemain S., 2006. Extraction aqueuse d'huile de colza assistée par hydrolyse enzymatique : optimisation de la réaction, caractérisation de l'émulsion et étude de procédés de déstabilisation. Thèse de doctorat, Lorraine, France : 75-77.
- Gonçalez, E., Felicio, J.D., et Pinto, M.M. Biflavonoids inhibit the production of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. Laboratoire des Produits Natural, Institut de Biologie, São Paulo, Brasil. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* Braz J Med Biol Res 34(11). pp 1453-1456.
- Gourama, H. (1991). Growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* in the presence of *Lactobacillus* spp. University of Nebraska. Lincoln
- Green ,A. G., & Marshall, D.,R.1981. Variation for oil quantity and quality in flax seed (*Linum usitatissimum*). *Austarlian journal of Agriculutral research*, 32 (4), P.599-607.
- Guerre, P. (2000). Intérêt des traitements des matières premières et de l'usage d'adsorbants lors d'une contamination des aliments du bétail par des mycotoxines. *Revue. Médecine vétérinaire.* Volume.151.N°12.P.1095-1106.
- Guerre,P., Galtier, P.,Burgat,V .(1996). Les aflatoxicoses chez l'animal : des manifestations clinique aux mécanismes d'action. *Revue Méd. Vét.* 147 (7).P.497-518.
- Gursoy, N., Sarac, B., Nedim, D., Ahmet, P., et al. (2008). Changes in spontaneous concentration of rat ileum by aflatoxin in vitro. *Turky: ELSEVIER*
- Gutierrez.C., Rubilar, M., Jara, C., Verugo, M., Sineiro,J., Shene, C.2010.Flaxseed and flaxeed cake as source of comonds for food industry.*J.soil Sci.plant nutr.*10(4).P.454-463.
- Gwladys, R; TAP, J. (2004). Les mycotoxines. Université Paris XII. Institut Universitaire Professionnalisé. Licence SIAL.
- Habs, M., Jahn, S. A. A., Schmähl, D. (1984). Carcinogenic Activity of Condensate from Coloquint Seeds (*Citrullus colocynthis*) after Chronic Epicutaneous Administration to Mice. Germany. *Cancer Research Clinical Oncology.* J Cancer Res Clin Oncol (1984)108:154-156 9. Springer-Verlag.
- Haidara A. O., 1996. Valorisation d'une huile de végétale tropicale : L'Huile de Pourghère. Mémoire, Sherbrooke, Canada. P 47-61.
- Hanafy, M.S.M., Hatem, M.E. 1991. Studies on the antimicrobial activity of *Nigella sativa* seed (black cumin). *J. Ethnopharmacol*, 34, p 275-278.
- Haris, C. (1989). Introduction to modern microbiology black wall scientific publication. p. 179.
- Hashim, F.M., El-Kiey, M.A. *Nigella sativa* seeds of Egypt. *J. Pharm. Sci. United. Arab. Rep.* 3: 121– 33, 1962.
- Hedayati, M. T., et al. (2007). *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology.* N°153. P. 1677–1692.
- Heintz, J.M. (1999). Réglementation européenne. Dans. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section de l'alimentation et de nutrition. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Partie XVII. Paris. (pp. 429-450). Lavoisier. Tec et doc.
- Hibar, K., Daami-Remadi, M., Jabnoun-Khiareddine, H., Znaïdi, I.E., El Mahjoub, M. (2006). Effet des extraits de compost sur la croissance mycélienne et l'agressivité du *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radiciisycopersici*. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* Vol. 10 (2). P. 101 – 108.

- Hosseinzadeh, H., et al. (2006). Effect of thymoquinone and *Nigella sativa* seeds oil on lipid peroxidation level during global cerebral ischemia-reperfusion injury in rat hippocampus. Iran. Elsevier. (pp 621-627)
- Houghton, P.I., Zarka, R., De las Heras, B., Hoult, J.R.S., 1995. Fixed oil of *Nigella sativa* and derived thymoquinone inhibit eicosanoid generation in leukocytes and membrane lipid peroxidation. *Planta Med.* 61, 33–36.
- HUFF W.E., KUBENA L.F. & HARVEY B. 1988.- Progression of ochratoxicosis in broiler chickens.- *Poultry Science*, 67, 1139-1146.
- HUMPHREYS, D.J. 1988. Nephrotoxins : Ochratoxin In : *Veterinary Toxicology*, 3^{ème} édition, 294-295, 356p, edit : Bailliere Tindall, London (GBR).
- Hwan Do,J.,Choi,D-K. (2007). Aflatoxins: Detection, Toxicity, and Biosynthesis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. Vol.12.P.585-593.
- Hwang,J.H, Lee,K.J.(2006). Reduction of aflatoxin B1 contamination in wheat by various cooking treatments. *Food Chemistry*. 98 .P. 71–75.
- Imtiaj, A., Lee, T.S. (2007). Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. *World journal of agricultural sciences*. Vol .3 (3).P.316-321.
- Iserin, P., et al. (2001). Larousse : Encyclopédie des plantes médicinales. 2^{ème} édition. (pp111)
- Jard, G. (2009). Etude de différents modes d'élimination biologique de la zéaralénone, mycotoxine présente dans les céréales : Adsorption et Biotransformation. Thèse de doctorat. Inédite, institut national polytechnique, université de Toulouse.
- Jayaraman R., Shivakumar A., Anitha T., Vishal D., Joschi, Narahari N., Palei. 2009. Antidiabetic effect of petroleum ether extract of *Citrullus colocynthis* fruits against streptozotocin-induced hyperglycemic rats. *Rom. J. Biol-Plant Biol.*54: 127-134.
- Jeanne-Armelle A. 2004. Albumine. *Biologie clinique*. [90-10-0075].
- Jemmali, J.1978. Détoxification des aliments destinés a la consommation humaine et animale contaminés par les mycotoxines. In rapport de la conférence mixte de FAO/OMS/ PNUE sur les mycotoxines. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture. Rome.;PP : 75-86.
- Jhala. Amit J. Linda M. Hall (2010). Flax (*Linum usitatissimum* L.): Current Uses and Future Applications. *Australian Journal of basic and Applied Sciences*, 4(9).
- Jouany, J.P. (2007). Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. *Animal Feed Science and Technology*. ELSEVIER. N°137. P.342–362.
- Juan, M. (octobre2007). Tendances & nouvelles laitiers. *Revue .PLM*. N°383. P.46–48.
- Kane A., Creppy E. E., Rosenthaler R et Dirheimer G. 1986. Changes in urinary and renal tubular enzymes caused by subchronic administration of ochratoxin A in rats. *Toxicology* 42, 233-243.
- Karleskind A. (1992) . Manuel des corps gras. Tec & Doc, Paris. pp 1579.
- Karunaratne, A., Wezenberg, E., Bullerman, B. (1990). Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp. *J food prot.*Vol (53). P. 3230-236.
- Kerkadi, A., Barrault, C., Marquardt, R., (1999), Cholestyramine protects against Ochratoxin A toxicity: role of Ochratoxin A sorption by the resin and bile acid entero hepatic circulation, *Journal of Food Protection*, 62, 1461-1465.
- Khan, F. W., Gul, P. (1975). *Puk. J. For.* Vol.25 (279).
- Klich, M.A. (2007). *Aspergillus flavus* : the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology*. 8(6), 713–722.
- Kra,K.D., Diallo, H.A., Kouadio, Y. J. (2009). Activités antifongiques de l'extrait de *Chromolaena odorata* (L.) King & Robins sur deux isolats de *Fusarium oxysporum* (E.F. Sm.) responsables du jaunissement mortel des feuilles des bananiers. *Journal of Applied Biosciences*. Vol. 24. P.1488 – 1496.

- Kumari, S., Kumari, D., Manjusha., et al. (2008). Antioxidant and free radical scavenging potential of *Citrullus colocynthis* (L.) Schrad. methanolic fruit extract. *Acta Pharm.* 58 (2008) 215–220. *Acta Pharm.* 58 (2008) 215–220.
Department of Pharmaceutical Sciences, Department of Botany, Kurukshetra University, Kurukshetra-136119, Haryana, India.
- Kusuhara H., and Sugiyama Y. 2002. Role of transporters in the tissue-selective distribution and elimination of drugs : transporters in the liver, small intestine, brain and kidney, *Journal of Controlled Release*, 78, 43-54.
- Kymäläinen, H.R. (2004). Quality of *linum usitatissimu* L. (flax and linseed) and *cannabis sativa* L. (fibre hemp) during the production chain of fibre raw material for thermal insulations. University of Helsinki. Department of Agricultural Engineering and Household Technology. Chain. (pp5-89)
- Laciakovà, A., Cabadaj, R., Pàstorovà, B., Conkovà, E., Kovàc, G., and Laciak, V., (1999), the effect of food additives on ochratoxin A, *Folia Veterinaria*, 2, 71-73.
- Levi, A., et Claude E. T. (2005). Polymorphisms among chloroplast and mitochondrial genomes of *Citrullus* species and subspecies. *USA. Genetic Resources and Crop Evolution* (2005) 52: 609–617. Springer.
- Linnaeus, C., 1857. *Species Plantarum*. The Royal Society of London, London, UK, pp: 300.
- Lopez-garcia, R., Park, D.L., Gutierrez, M.B. (1999). procédé pour réduire la présence des mycotoxines dans les denrées alimentaires. Dans. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section de l'alimentation et de nutrition. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque. Chapitre XV. Quatrième Partie : gestion du risque. (pp. 387-404). Lavoisier, France : Technique & Documentation.
- Lopez Grio, S.J., Frenich, A.G., Martinez Vidal, J.L., Romero-Gonzalez, R. (2010). Determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 and Ochratoxine A in animal feed by ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Sep. Sci.* 33. P.502–508.
- Lucht, J; Rüegg, J.P. (2007). Maïs doté d'un gène désintoxiquant. *Point. L'actualité de la biotechnologie végétale*. N°65. P.1.
- Mahmoud, A.L.E. (1994). Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. *Lett. Appl. Microbiol.* vol.19. P.110-113.
- Mally A., Zepnik, H., Wanek P., Eder E., Dingley K, Ihmels H., Volkel, W., and Dekant, W. (2004), ochratoxin A: lack of formation of covalent DNA adducts. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 234-242.
- Manderville, R. A. (2005), A case for the genotoxicity of ochratoxin a by bioactivation and covalent DNA adduction. *Chemical Research In Toxicology* 18, 1091-1097.
- Manderville, R. A., and Pfohl-Leszkowicz, A. (2006), Genotoxicity of chlorophenols and ochratoxin A. *Advances in Molecular Toxicology* (sous presse),
- Marzouk, B., Marzouk, Z., Décor, R. (2009). Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. Tunisia. *Journal of Ethnopharmacology* 125 (2009) 344–349. Elsevier.
- Matheron, G., Amsallem, I., Puygrenier, M., Abecassis, J., et al. (2005). Étudier les contaminants chimiques ou microbiens des aliments. *Alimentation, Nutrition, Santé*. N°2. P. 18-21.
- Maznah, I., et al. (2009). *Nigella sativa* thymoquinone-rich fraction greatly improves plasma antioxidant capacity and expression of antioxidant genes in hypercholesterolemic rats. Elsevier. (pp664-672)
- Meddah, B., et al. (2008). *Nigella sativa* inhibits intestinal glucose absorption and improves glucose tolerance in rats. Elsevier Ireland Ltd. (pp419-429)
- Mehmet, K., Halit, D., Cengiz, K., Hanefi, O. (2005). Gastroprotective activity of *Nigella sativa* L oil and its constituent, thymoquinone against acute alcohol-induced gastric mucosal injury in rats. *World Journal of Gastroenterology*. 11 (42). P. 6662-6666.

- Mebarki K; Chaoufi K; Sanba A. 2010. Evaluation de l'activité antifongique de quelques huiles (huile de coloquinte –huile de nigelle-huile de lin) sur une souche d'*Aspergillus flavus* productrice d'aflatoxine. Mémoire d'ingénierie. Université de Béchar.
- Meisner H., Cimbala M. A., Hanson R. W. 1983. Decrease of renal phosphoenolpyruvate carboxykinase RNA and poly (A)⁺ RNA level by ochratoxin A. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 223, 264
- Meisner H., and Cimbala M.A. 1986. Effects of ochratoxin A on gene expression in rat kidneys, *Dev. Toxicol. Environ.*, 12, 261-271.
- Meisner H., and Selanik P. 1979. Inhibition of ochratoxin. *The Biochemical Journal* 180, 681-684.
- Meissonnier, G.M., Oswald, I.P., Galtier, P. (2005). Aflatoxicoses chez le porc Étude bibliographique de données cliniques et expérimentales. *Revue Médecine Vétérinaire*. 156 (12). P. 591-605.
- Meki, A.R., Hussein, A.A., (2001), Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 130, 3, 305-313.
- Meral, I., Donmez, N., Baydas, B., Belge, F., Kanter, M. (2004). Effect of *Nigella sativa* L. on heart rate and some haematological values of alloxan-induced diabetic rabbits. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*. 31 (1). P.49-53.
- Meunier, J.D. (2003). La silice, une bienfaitrice peu connue pour les plantes. *Revue. Echos science*. N°3. P. 9-11.
- Meziti, A. (2009). Activité antioxydante des extraits des graines de *Nigella sativa* L'étude in vitro et in vivo. Thèse de magistère. Inédite, université El-haj Lakhdar. Batna.
- Miljkovic, A., Pfohl-Leskowicz, A., Dobrota, M., Mantle, P.G., (2002), Comparative responses to mode of oral administration and dose of Ochratoxin A or nephrotoxic extract of *Penicillium polonicum* in rats, *Experimental and Toxicological Pathology*, 54, 305-312.
- Min, W., et al. (2010). Rheological properties of extruded dispersions of flaxseed-maize blend. China. Central Laboratory, Middle East Technical University, Ankara, Turkey. Elsevier (pp480-491)
- Molinié, A., (2004), Qualité sanitaire des blés en région Midi-Pyrénées : suivi du taux de contamination en mycotoxines de stockage (ochratoxine A et citrinine), Etude des effets biologiques de l'exposition à ces deux toxines. Mémoire de thèse.
- Moularat, S., Robine, E. (2006). Mesure des mycotoxines aéroportées. *Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique*. France : ELSEVIER. Vol.46. P.180–183.
- Mueller, K., et al. (2010). Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). Elsevier.(pp453-460)
- Muhizi, T. (2008). Synthèse d'aminosucres conduisant a des biocides d'origine naturelle. Thèse de doctorat. Inédite, École doctorale : sciences chimiques. Université bordeaux.
- Munro, C., Moodie, A., Kuiper-Goodman, T., Scott, P.M., and Grice, H.C., (1974), Toxicologic changes in rats fed graded dietary levels of Ochratoxin A, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 28, 180-188.
- Nazrul, I., Ahsan, M., Choudhury, M. H., Abdul malek, M. (1989). Antifungal activities of the oils of *Nigella sativa* seeds. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2(1). P. 25 – 28.
- Ndéye, A.K. (2001). Etude de la composition chimique et de la qualité d'huiles végétales artisanales consommées au Sénégal. Thèse de doctorat. Inédite, Université cheikh anta diop de dakar. Senegal.
- Nemmiche S., Chabane-Sari D., Guiraud P. 2007. Role of α -tocopherol in cadmium-induced oxidative stress in Wistar rat's blood, liver and brain. *Chemico-Biological Interactions*. 170: 221–230.
- Nevin, I., Dilara S. (2005). Protective effect of *Nigella sativa* seeds on ccl4-induced hepatotoxicity. *Firat Üniversitesi Sağlık Bilimleri*. 19 (3), 175-179.

- Nguyen minh tri, M. (2007). Identification des espèces de moisissures potentiellement productrice de mycotoxines dans le riz commercialise dans cinq provinces de la région centrale du Vietnam-étude des conditions pouvant réduire la production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Inédite, Institut nationale polytechnique .Toulouse.
- Nmila, R., Rchid, H., Gross, R., et al. (2002). Mise en évidence d'un effet insulino-stimulant de fractions de graines de coloquinte (*Citrullus colocynthis* L. Schrader). *Biologie & Santé* vol. 2, n° 2, 2002. Maroc.
- Obeid M.. (1996). Physico-chemical properties and industrial uses of *Citrullus colocynthis* seed oil. M. Sc. Thesis, National Oil Seed Processing Research Institute, University of Gezira, Sudan
- Obeta, J.A.N., et Ariba, C. (1994). Microbiology of controlled rotting of egusi (*Colocynthis citrullus* L.) fruits for the harvesting of the seeds. Nigeria . *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 10.634-636. Vol 10.
- O'Brien E; Heussner A ; Dietrich D. 2001. Species-, sex-, and cell type-specific effects of ochratoxin A and B. *Toxicological Sciences: An Official Journal Of The Society Of Toxicology*. 63: 256-264.
- Offonry, S. U., et Achi, O. K. (1998). Microbial populations associated with the retting of melon pods (*Colocynthis citrullus* L.) during seed recovery. Nigeria. *Plant Foods for Human Nutrition* 52: 37-47, 1998. *Kluwer Academic Publishers*.
- Ollé M., 2002. Analyse des corps gras. Bases documentaires: techniques d'analyses; Référence P3325; Ed. Techniques de l'ingénieur. <http://www.techniques-ingenieur.fr>
- Oomah, D., et Tanya, B. (2005). Thermal characteristics of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) proteins. Canada. Elsevier. (pp 733-741)
- Ouraini, D., Agoumi, A., Ismaili-Alaoui, M., Alaoui, K., et al. (2005). Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie*. N°4: 147-157. Springer.
- Palot, A., Charpin-Kadouch, C., Dumon, H., Charpin, D. (2009). Non-allergic disorders associated with domestic moulds. Numéro FMC. Outdoor pollution séries.
- Pang K.S et Gillette J.R., 1978. Kinetics of metabolite formation and elimination in the perfused rat liver preparation: differences between the elimination of preformed acetaminophen and acetaminophen formed from phenacetin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207, 178- 194.
- Pang K.S et Rowland M. 1977. Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "wellstirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow,
- Parent-Massin, D. (2007). Risques dus à la présence de Contaminants naturels dans l'alimentation : Des Mycotoxines. Dans. *Qualité sanitaire des aliments issue de production végétale*. France. Académie d'Agriculture de France.
- Park D. 2002. Effect of processing on aflatoxin. *Adv Exp Med Biol* :173-9.
- Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L., and Pohland, A.E., (1988), Review of decontamination of aflatoxin by amination : current status and regulation. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 685-702.
- Paterson, C.A. (2008). Acide gamma-linolénique. la qualité et dans notre nature. *Agriculture et agroalimentaire*. Canada.
- Petkova-Bocharova, T., Stoichev, I. I., Chernozemsky, I. N., Castegnaro, M., and Pfohl-Leszkowicz, A., (1998), Formation of DNA adducts in tissues of mouse progeny through transplacental contamination and/or lactation after administration of a single dose of ochratoxin A to the pregnant mother. *Environmental And Molecular Mutagenesis* 32, 155-162.
- Pfohl-Leszkowicz, A. (2009). Mycotoxines : facteur de risque de cancers. *Journal africain du cancer*. Springer-Verlag. Vol 1. (1). P. 42-55.
- Pfohl- Leszkowicz, A. (1999). Chapitre : définition et origines des mycotoxines. Dans. Première partie : les agents mycotoxiques. Dans. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section de l'alimentation et de nutrition. *Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque*, (pp. 3-14). Lavoisier, France : Technique & Documentation

- Pfohl-Leszkowicz, A. (1999). Chapitre II : Ecotoxicogénèse. Première partie : les agents mycotoxiques. Dans. Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section de l'alimentation et de nutrition. Les mycotoxines dans l'alimentation : évaluation et gestion du risque, (pp. 17-30). Lavoisier, France : Technique & Documentation.
- Pfohl- Leszkowicz A. (1999). Métabolisation Des Mycotoxines. Dans Conseil supérieur d'hygiène publique de France, section de l'alimentation et de nutrition. Les mycotoxines dans l'alimentation évaluation et gestion du risque, (pp. 37-55) Lavoisier, France : Technique & Documentation.
- Pitt,J.I., Basilico,J.C.,Abaraca,M.L., Lopez,C. (2000). Mycotoxins and toxigenic fungi. Medical Mycology. Volume .38. N°1. P. 41-46.
- Pitt,J.I.,Hocking,A.D.(2009). *Aspergillus* and related teleomorphs. In Fungi and food spoilage. Chapter 8. Third edition. Springer.P.275-295.
- Park, D.L., Lee, L.S., Price, R.L., and Pohland, A.E., (1988), Review of decontamination of aflatoxin by amoniation : current status and regulation. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71, 685-702.
- Pohland, A. E., Nesheim S., and Friedman, L., (1992), Ochratoxin A: a review. Pure and Applied Chemistry, 64, 1029-1046.
- Poulin,M., d'Halewyn, M-A.,Leclerc, J.M., King,N., et al. (2002). Les risques à la santé associées à la présence de moisissures en milieu intérieur. Institut national de santé publique du Québec.pp.166.
- Quillien, J-F. (2002). Les mycotoxines. Institut National de la Recherche Agronomique. France. PME .N° 3. (24 pp).
- Rasooli, I., et Owlia, P. (2007). Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. Iran. International Journal of Food Microbiology. 122 (2008) 135- 139. Elsevier.
- Reboux, G. (2006). Mycotoxines : effet sur la santé et interaction avec d'autres composants organique. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique. Vol.46.P.208–212 .France. Elsevier.
- Reddy, k.R.N., Reddy, C.S., Muralidharan, K. (2008). Potential of botanicals and biocontrol agents on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* infecting rice grains. Inde. Food control. Elsevier.
- Remmal,A.1993. improved method for determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. J. essent .Oil Res.,5(2).179-184.
- Richard, J.L. (2007). Some major mycotroxins and their mycotoxiques—An overview. International Journal of Food Microbiology .vol.119 .P. 3–10. Elsevier Science.
- Ringot, D. (2008). Contaminants naturels de la chaîne alimentaire et cancer : la gestion du risque associé aux mycotoxines. 4ème forum Agrosanté. (pp. 37-55) Institut Polytechnique. LaSalle, Beauvais
- Roose-Amsaleg, C.,et al. (2006). Polymorphic microsatellite loci in *Linum usitatissimu*.Journal Compilation. Blackwell Publishing. (pp 796–799)
- Rouvier M.2002. L'ochratoxine A : nature, origine et toxicité. Thèse de doctorat. Inédite, Ecole National Vétérinaire.Toulouse.
- Royer,J., Tap,G. (2004). Les mycotoxines. Institut Universitaire Professionnalisé Université Paris.
- Ruppol, P., Delfosse, Ph., Hornick J.-L. (2004). La contamination de la filière laitière par les mycotoxines : un risque pour la santé publique en Afrique subsaharienne. Ann. Méd. Vét. N°148. P.141-146.
- Ryu D., Jackson L; Bullerman L. 2002. Effects of processing on zearalenone. Adv Exp Med Biol :205-16.
- Saleh Ramdan B ; 2007; Evaluation biologique et toxicité aigüe des extraits aqueux et organiques de quelques plantes médicinales du sude oueste Algérien; Mémoire de magistère en chimie organique appliqué; université de Béchar.
- Sadeghi, N., Reza Oveisi, M., Jannat, B., Hajimahmoodi, M., et al. (2008). incidence of aflatoxine M₁ in human breast milk in Tahren, Iran. Tahren, Iran .ELSEVIER. Vol. 20.P.75–78.

- Salgarolo P., 2003. Pratique des manipulations de chimie- à l'usage des biologistes. Techniques & documentation- Lavoisier : 229-237.
- Satrani, B. et al., 2001. Composition chimique et activité antimicrobienne des huiles essentielles de *Satureja calmintha* et *Satureja alpine* du Maroc. *Ann. Falsif. Chim. Toxicol.* ,94(956); 241-250.
- Sawaya, N.W., Dagher, J. N., Khalil, K. J. (1986). *Citrullus colocynthis* Seeds as a Potential Source of Protein for Food and Feed.. *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 34, No. 2. American Chemical Society.
- Schafferman, D., Beharav, A., Shabelsky , E., et Yaniv, Z. (1998). Evaluation of *Citrullus colocynthis*, a desert plant native in Israel, as a potential source of edible oil. *Journal of Arid Environments*. Vol. 40. P.431-439.
- Schlatter, C., Studer-Rohr, J., and Rasonyl, T., (1996), Carcinogenicity and kinetic aspects of Ochratoxin A. *Food Additives and contaminants*, 13, 43-44.
- Scholz, M., et al. (2009). Methyl jasmonate induced accumulation of kalopanaxsaponin I in *Nigella sativa*. Elsevier. (pp517-522)
- Schauenberg, P., et Paris, F.(2006) .Guide des plantes médicinales. Delachaux et Niestlé.Paris, chapitre 14 : plantes saponosides nombre de page de chapitre (pp233-253).
- Schauenberg, P., et Paris, F. (2006) .Guide des plantes médicinales. Delachaux et Niestlé.Paris, chapitre 12: plantes a vitamines nombre de page de chapitre pp.55-68.
- Scott P. M. 1996. Effects of processing and detoxification treatments on ochratoxin A: introduction. *Food Addit Contam* : 19-21.
- Sebbagh, N., Cruciani-Guglielmacci, C., Ouali, F., et al. (2009). Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Algeria. Diabetes & Metabolism* 35 (2009) 178–184. Elsevier Masson SAS.
- Sebbagh N ; Chabane Sari D ;Taleb SA ; Benyoucef M ; Lahouel M ; Ktorza A ; Magnan C. 2007. Effect of dietary colocynthis and sun flower fatty acids containing oils on lipids metabolism and on antioxidant stress parameters in streptozotocine-induced diabetics rats. *Res J applied Sci.* 2: 832-838.
- Senhaji, O., Faid, M., Elyachioui, M., Dehhaoui, M. (2005). Etude de l'activité antifongique de divers extrait de cannelle. Maroc. *Journal de Mycologie Médical.* 15 (2005). 220-229. ELSEVIER.
- Serghat, S., A. Mouria, A., Ouazzani touhami, A., Badoc, A., Douira,A. (2004). Effet de quelques fongicides sur le développement in vitro de *pyricularia grisea* et *helminthosporium oryzae*. *Bull. Soc. Pharm.* Vol.143. P.7-18.
- Sherif. O., Salama, E., Mosaad, A. (2008). Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. Dans. *International journal of Hygiene and Environmental Health.* Egypte. Science Direct Elsevier. Vol.212. P.347–368.
- Shitara Y., Sato H., Sugiyama Y. 2005. Evaluation of drug–drug interaction in the hepatobiliary and renal transport of drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 689–723.
- Singh, G., Marimuthu,P.,Heluani, C., Catalan, c. (2005). Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture.* Vol. 85. P. 2297–2306.
- Singh, P., Kumar, A., Dubey, N.K., Gupta, R. (2009). Essential Oil of *Aegle marmelos* as a Safe Plant-Based Antimicrobial Against Postharvest Microbial Infestations and Aflatoxin Contamination of Food Commodities. *Journal of food science.* Vol. 74 (6).P.302-307.
- Singh, A. K., Yadava, K. S. (1978).*Indian Journal of agricultural science.*Vol. 48(766).
- Soro,S., Ouattara, D., Guédé, N.Z.,Coffi, K., et al. (2010).Effet Inhibiteur in Vitro et in Vivo de l'extrait de Poudre et de l'huile Essentielle de *Xylopia Aethiopica* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae) sur *Fusarium oxysporum* f. sp *Radici-lycopersici* (Forl), Champignon Parasite des Cultures de Tomate .*European Journal of Scientific Research* Vol.39(2).P.279-288.
- Stoev, S.D., Djuvinov, D., Mirtcheva, T., Pavlov, D., Mantle, P., (2002), Studies on some feed additives giving partial protection against ochratoxin A in chicks, *Toxicology Letters* 135, 33-50.

- Sudhakar, P., Latha, P., Sreenivasulu, Y., et al. (2009). Inhibition of *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin (AFB₁) in peanut by methyleugenol. India. Indian Journal of Experimental Biologie. Vol. 47. pp 63-67.
- Tabuc, C. (2007). Flore fongique de différents substrats et conditions optimales de production des mycotoxines. Thèse de doctorat. Inédite, institut national polytechnique, université de Bucarest. Toulouse.
- Tahani, N .Elamrani, A. (2008). Utilisation des produits de boulangerie rassis comme aliment pour animaux : risque et danger. Revue les technique de laboratoire. N°10.P.4-9.
- Tauseef, M. (2009). Characterization of black cumin seed oil and exploring its role as a functional food. Thèse de doctorat. Inédite, national institute of food science and Technology University of agriculture. Faisalabad.
- Teeter T et Franciscus A. 2004. Comment interpréter un rapport de laboratoire : notions élémentaires. Fichederenseignementshcs. Version 1.0. p 1-3.
- Thanaboripat, D., Mongkontanawut, N., Suvathi, Y., et al. Inhibition of Aflatoxin production and growth of *Aspergillus flavus* by Citronella oil. Thaïlande.
- Torkey, H.M., Abou-Yousef, H.M., Abdel Azeiz, A.Z., et al. (2009). Insecticidal Effect of Cucurbitacin E Glycoside Isolated from *Citrullus colocynthis* Against *Aphis craccivora*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 3(4): 4060-4066, 2009. Egypt.
- Tozlovanu, M. (2008). Evaluation du risque de contamination alimentaire en mycotoxines néphrotoxiques et cancérigènes (notamment l'ochratoxine A) : Validation de biomarqueurs d'exposition et d'effet. Thèse de doctorat. Inédite, Ecole doctorale Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques Bioingénieries. Toulouse.
- Tubajika, K.M. (2006). Efficacy of alkyl dimethyl benzyl amonium chlorid on supression of physalospora vaccinii in laboratory assays. Journal of food protection. Vol.69 (10). P.2460-2464.
- Turesky, R. J., (2005), Perspective: ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen. Chemical Research In Toxicology 18, 1082-1090.
- Uruakpa, F.O., et Aluko, R.E. (2004). Heat-induced gelation of whole egusi (*Colocynthis citrullus* L.) seeds. Canada. Food Chemistry 87 (2004) 349–354. Elsevier.
- Verma R.J., and Shalini M. 1998. Hyperglycemia induced in rabbits exposed to ochratoxin. Bull.EnvIRON.Contam.Toxicol. 60, 626-631.
- Vigier, V. (2008). Outils de gestion des risques : les plans de surveillance et de contrôle de la direction générale de l'alimentation (DGAL). Bull. Acad. Vét. France. Tome 161. N°3. P. 279-285.
- Wang,.S. Chen,. P F. Chang,. S T, (2005). Antifungal activites of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*cinnamomum osmophleoum*) wood decay fungi. Bioresource technology
- Wichtl, M., Anton, R., Czygan, F.C , Frohne, D., Hiller, K., Nagell, A., et al.(2003).plantes thérapeutiques.2^{ème} édition.lavoisier.TEC &DOC.(pp342-343)
- Wolfgang, H. (2000). Plantes médicinales guides nature. Hachette édition. Paris.191 p.
- Yamazaki M., Suzuki H., Sugiyama Y., 1996. Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. Pharm. Res. 13, 497–513.
- Yaniv, Z., Shabelsky, E.,Schafferman, D.(1999). Colocynth: Potential Arid Land Oilseed from an Ancient Cucurbit. J. Janick (ed.), ASHS Press, Alexandria, VA.P. 257-261.
- Yiannikouris, A , Jouany, J-P. (2002). Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. INRA Productions Animales. Vol 15. (1), (pp 3-16).
- Yingying, X., Clifford, H., Charlene, W.H., Frank, M. (2008). Fungistatic activity of flaxseed in potato dextrose agar and a fresh noodle system. International Journal of Food Microbiology. Vol.121.P.262–267.

- Zamir, D., Navot, N., Rudieh, J. (1984). Enzyme Polymorphism in *Citrullus lanatus* and *C. colocynthis* in Israel and Sinai. *Plant Systematics and Evolution*. P1. Syst. Evol. 146, 163-170 (1984). Springer-Verlag.
- Zaoui, A., Amarouch, H., Cherrah, Y., Mahassini, N., et al. (2002). Acute and chronic toxicity of *Nigella sativa* fixed oil. *Phytomedicine Journal*. Vol 39.P.69-74.
- Zinedine, A. (Octobre 2004). Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse de doctorat inédite, Université sidi Mohammed ben abellah. Maroc.
- Zinedine, A., Mañes, J. (2009). Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control* .Vol .20.P. 334-344.
- Ziyada. A.K .,Elhussien.S.A. 2008,Physical and Chemical Characteristics of *Citrullus lanatus* Var. *Colocynthoide* Seed Oil. , University of Gezira,Wad Medani, P.O. Box 320, Sudan . *Journal of Physical Science*, Vol. 19.2, 69-75,

ANNEXE I

Milieux de culture et reactifs

Milieu PDA (Potatoes Dextrose Agar)

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

Milieu MEA (Malt Extract Agar)

Matière Sèche	50 g
Agar	5 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu YES (Yeast Extract Sucrose)

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

Czapek Concentre

NaNO ₃	30 g
KCL	5 g
MgSO ₄	5 g
FeSO ₄	0.1g
Eau distillée	100 ml

Milieu CYA (Czapek Yeast Agar)

Czapek Concentre	10 ml
KH ₂ PO ₄	1 g
Extrait de levure	5 g
Sucrose	30 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml

Milieu G25N (25 % Glycérol Nitrate Agar)

KH ₂ PO ₄	0.75 g
Czapek Concentre	7.5 ml
Extrait de levure	3.7 g
glycerol	250 g
Agar	12 g
Eau distillée	750 ml

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

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

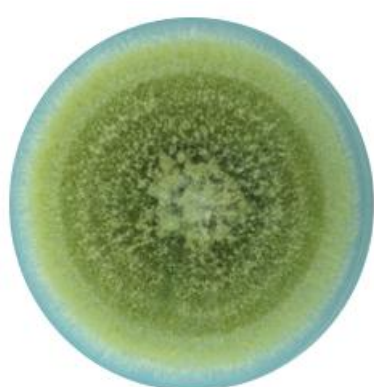
Eau physiologique

NaCl	9 g
Eau distillée	1000 ml

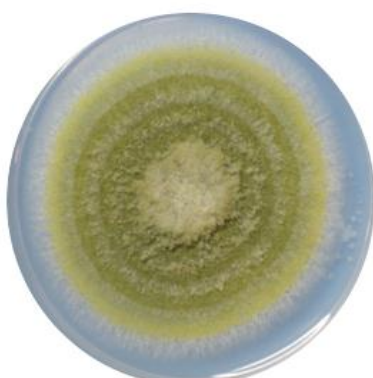
Milieu PDB (Potatoes Dextrose Broth)

Pomme de terre (macération 500ml de filtrat)	200 g
Sucrose	10 g
Eau distillée	1000 ml

ANNEXE II



Témoin



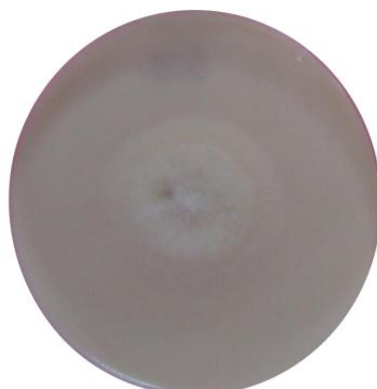
Témoin



50µl/m



100µl/ml



150µl/ml



200µl/ml



250µl/

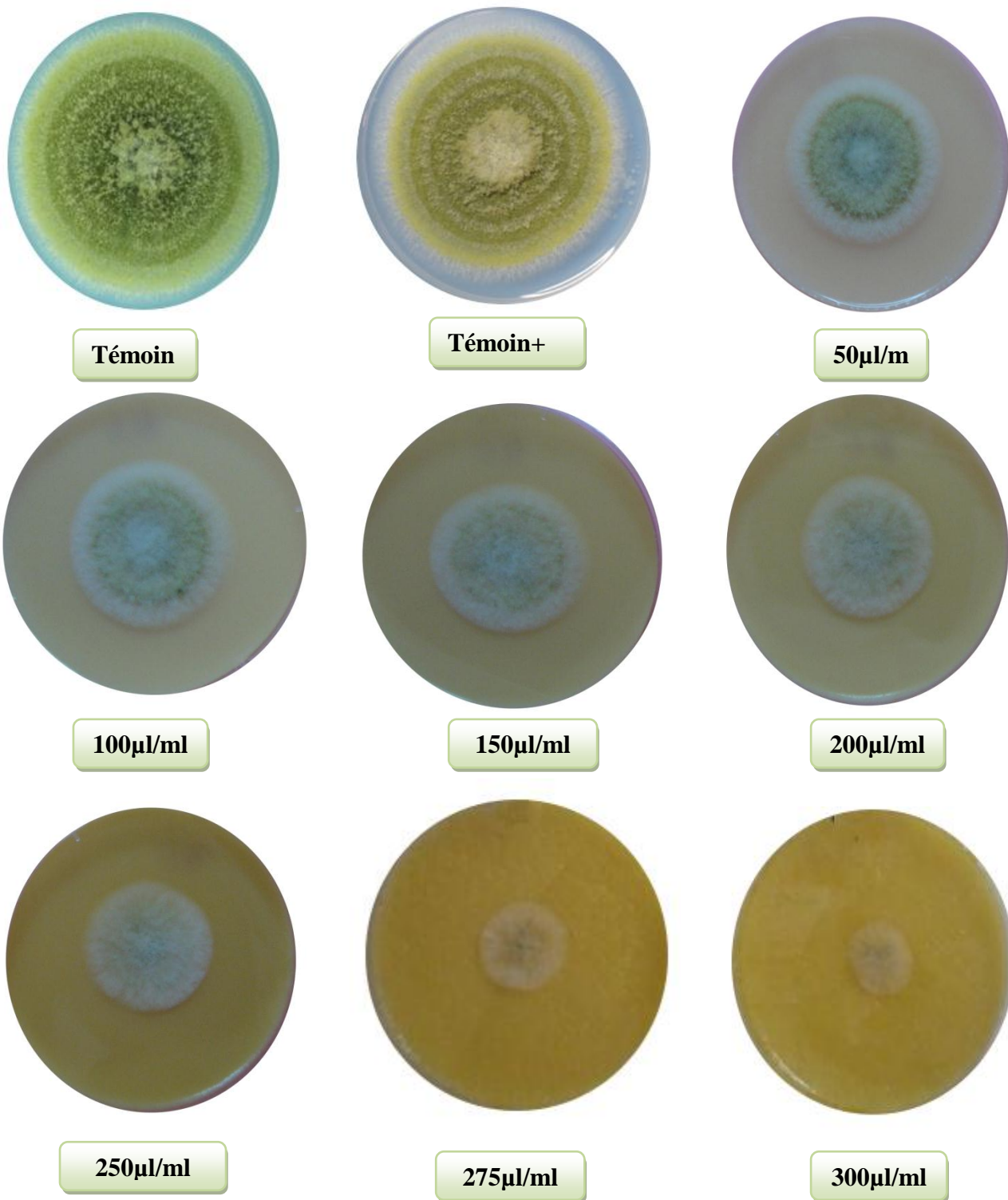


275µl/ml

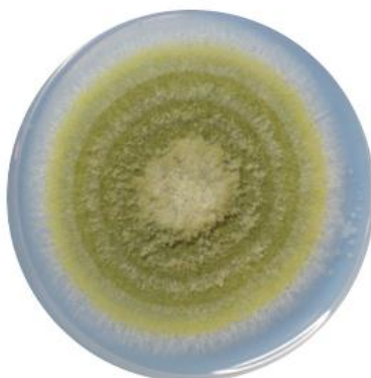
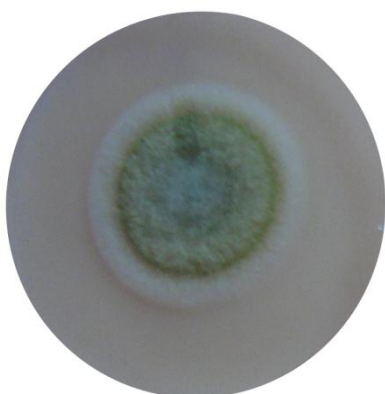
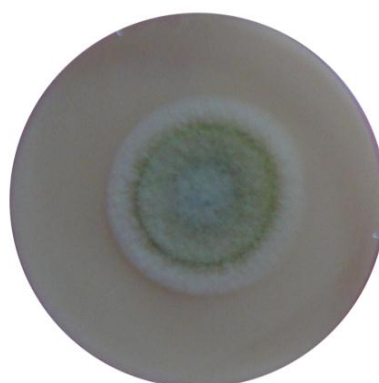


300µl/ml

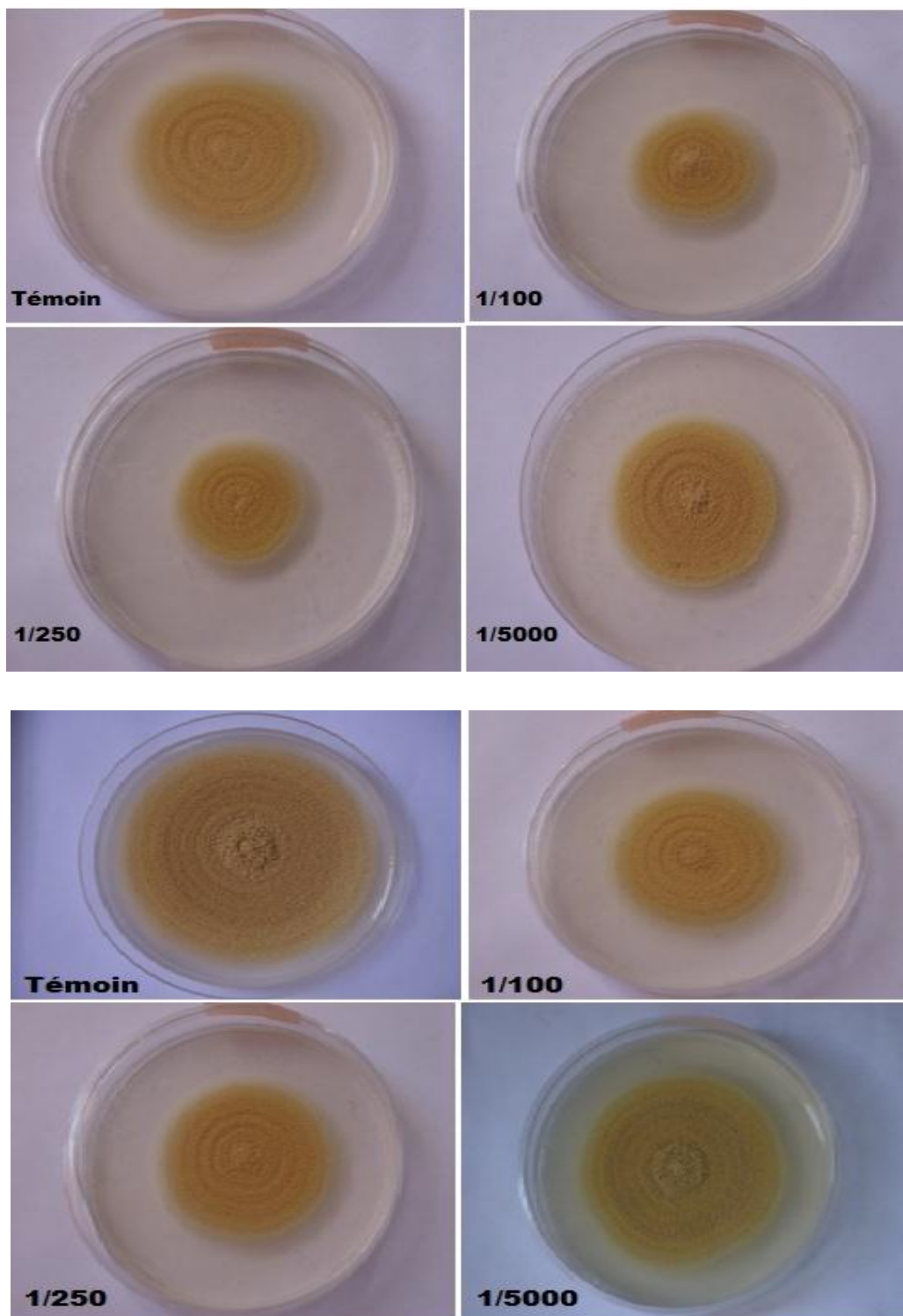
Spécimens de la croissance radiale de la souche *A. flavus* sous l'effet des différentes concentrations de l'huile de nigelle



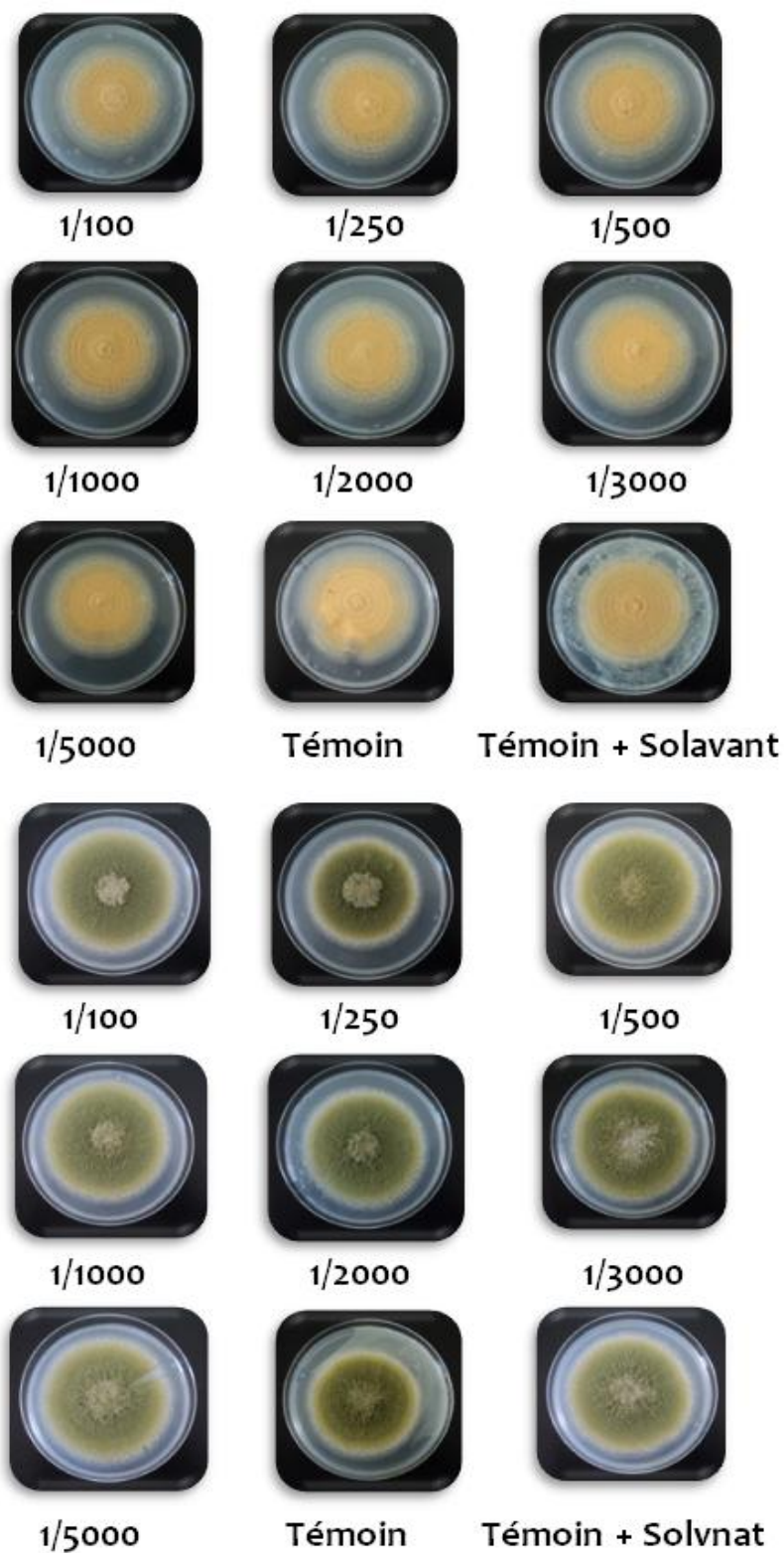
Spécimens de la croissance radiale de la souche *A. flavus* sous l'effet des différentes concentrations de l'huile de lin

**Témoin****Témoin+****50µl/ml****100µl/ml****150µl/ml****200µl/ml****250µl/ml****275µl/ml****300µl/ml**

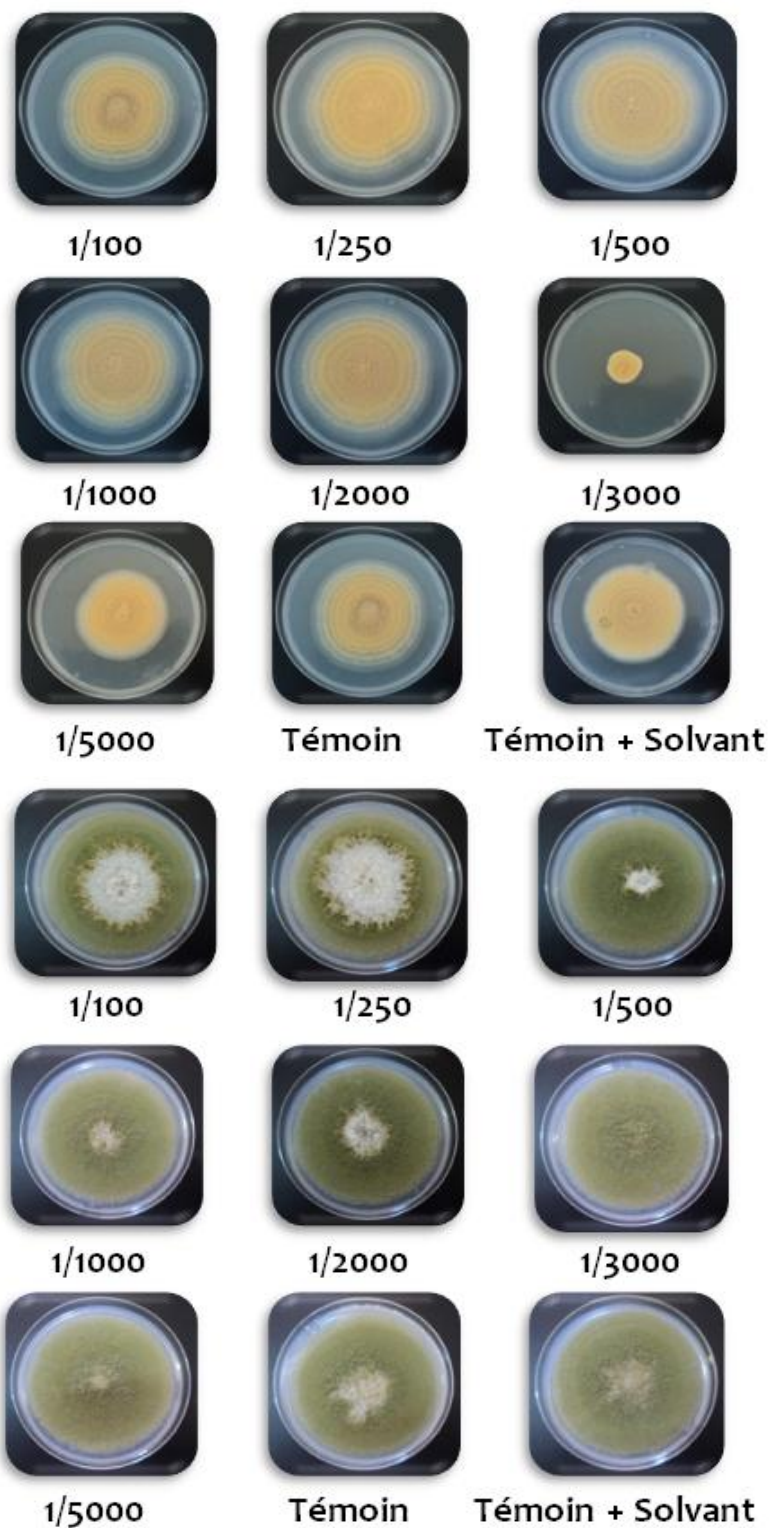
Spécimens de la croissance radiale de la souche *A. flavus* sous l'effet des différentes concentrations de l'huile coloquinte



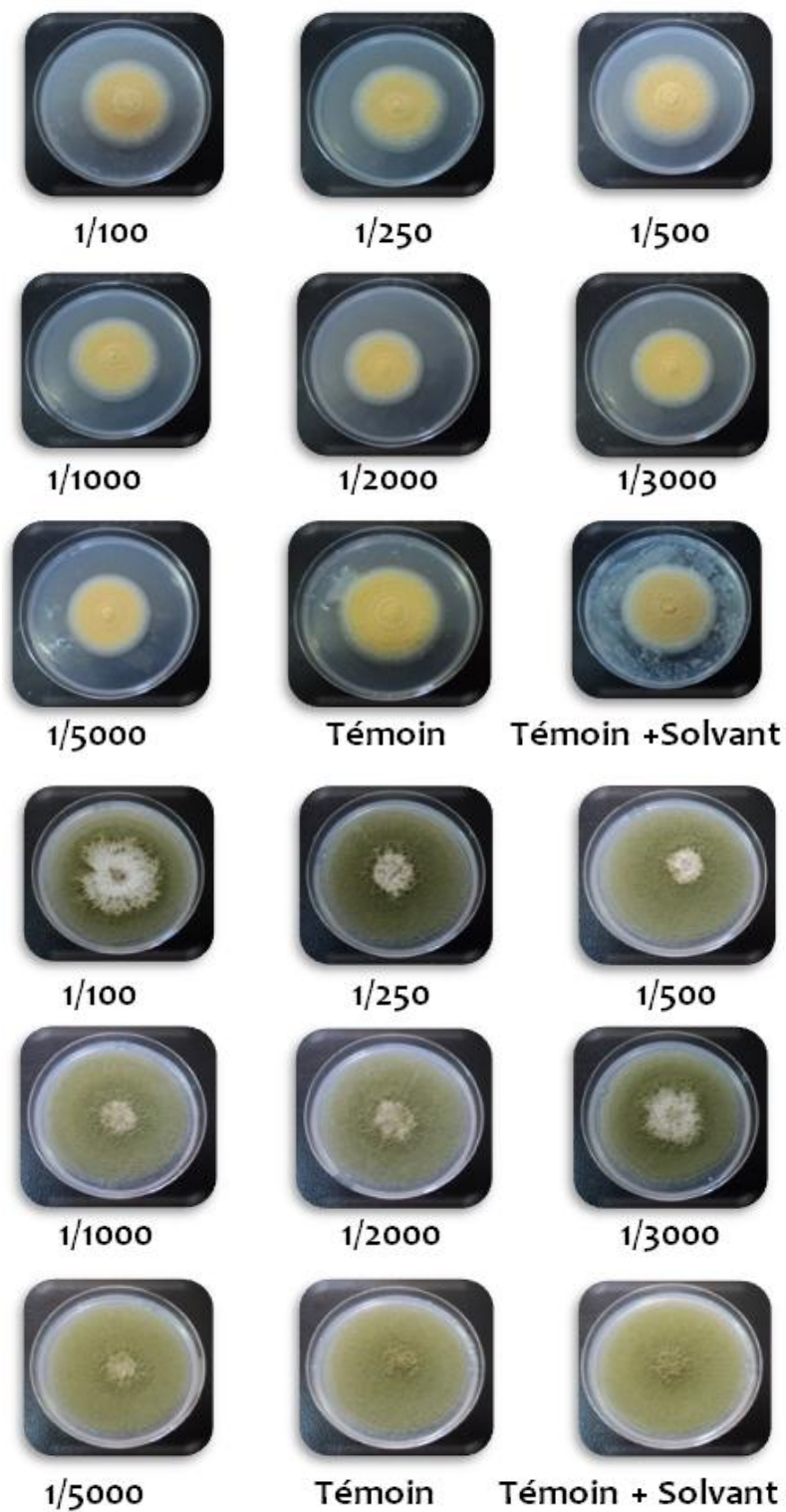
Spécimens de la croissance radiale de la souche *A.ochraceus* sous l'effet des différentes concentrations de l'huile de coloquinte



Specimens de photos de la croissance radiale des souches testées sous l'effet des différentes concentrations HL/HC



Specimens de photos de la croissance radiale des souches testées sous l'effet des différentes concentrations HN/HC



Specimens de photos de la croissance radiale des souches testées sous l'effet des différentes concentrations HL/HN



Specimens de photos de la croissance radiale des souches testées sous l'effet des différentes concentrations HC/HL/HN

ANNEXE III

Appareillage et instruments utilisés



Soxhlet



Rotavapor



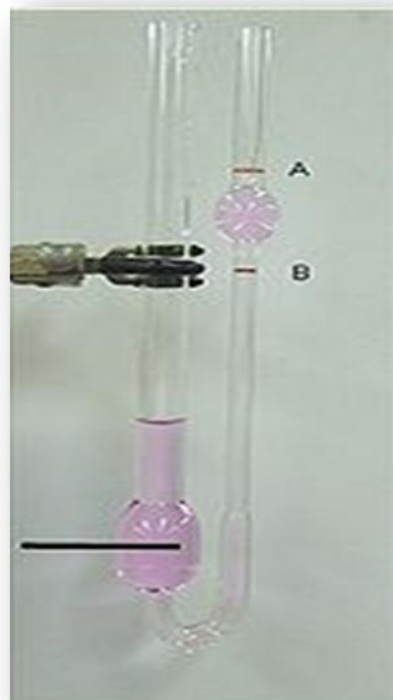
Réfractomètre



Montage à reflux



Montage de la viscosité



Viscosimètre capillaire



Montage de la chromatographie sur colonne



Infra-rouge



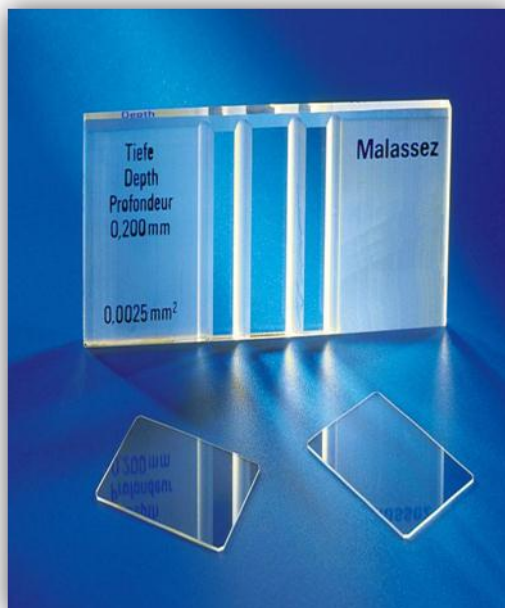
Incubateur



Spectromètre d'absorption UV-visible



Pycnomètre



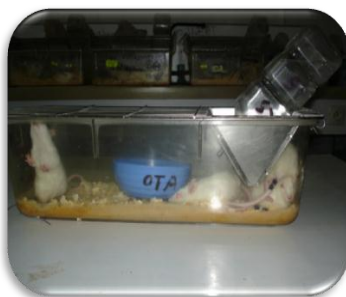
Cellule de Malassez



STANDART AFB1



STANDART OTA





Contents lists available at ScienceDirect

Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtb

Document heading

doi:

© 2013 by the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. All rights reserved.

Evaluation of antifungal activity of free fatty acids methyl esters fraction isolated from Algerian *Linum usitatissimum* L. seeds against toxigenic *Aspergillus*

Amrouche Abdelillah^{1,2}, Benmehdi Houcine^{3*}, Dalile Halima³, Chabane sari Meriem¹, Zaaboub Imane³, Smahi Djamel Eddine¹, Moussaoui Abdallah², Chabane sari Daoudi¹

¹Laboratory of Natural Products Research (LAPRONA) University of Tlemcen, Algeria

²Laboratory of Plant Resource Development and Food Security in Semi Arid Areas, South West of Algeria, University of Bechar, Algeria

³Faculty of Sciences and technology, Department of Technology, University of Bechar 08000 Algeria

PEER REVIEW

Peer reviewer

Abdelouahid Djamel Eddine, University AbouBeukr Belkaid (Tlemcen Algeria), Faculty SNV' STU, Department of biology.

E-mail: djamdine11@yahoo.fr

Comments

This contribution can be a remedy for the gravity and the abundance of the contamination of the foodstuffs. Indeed, FAMES of seeds of *L. usitatissimum*, exit of the Bechar (Algeria) area, showed an appreciable activity about (54.19% and 40.48%) successively on *Aspergillus F* and *A. oracles*. This antifungal capacity can be due to the abundance of the linoleic and linolenic acids in the linseed oil which seems promising to treat the fungi infections, the mushrooms of storage and deterioration of food in the field of food industry.

Details on Page 447

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of the major fraction of fatty acids methyl esters (FAMES) isolated from *Linum usitatissimum* L. seeds oil collected from Bechar department (Algeria). **Methods:** The assessment of antifungal activity was carried out in terms of percentage of radial growth on solid medium (*potatoes dextrose agar* PDA) and biomass growth inhibition on liquid medium (*potatoes dextrose broth* PDB) against two fungi. **Results:** The FAMES was found to be effective in inhibiting the radial mycelial growth of *Aspergillus flavus* more than *Aspergillus ochraceus* on all tested concentrations. The highest antifungal index was found to be (54.19%) compared to *Aspergillus ochraceus* (40.48%). The results of the antifungal activity of the FAMES inhibition of biomass on liquid medium gave no discounted results, but this does not exclude the antifungal activity. **Conclusions:** We can assume that the observed antifungal potency may be due to the abundance of linoleic and α -linolenic acids in linseed oil which appears to be promising to treat fungal infections, storage fungi and food spoilage in food industry field.

KEYWORDS

Antifungal activity, FAMES, *Linum usitatissimum* L., Extraction, *Aspergillus*

1. Introduction

Fungi are the main infectious agents in plants, causing alterations during developmental stages including post-

harvest. In fruit and vegetables, there is a wide variety of fungal genera causing quality problems related to aspect, nutritional value, organoleptic characteristics, and limited shelf life[1]. In addition, in some cases fungi are indirectly

*Corresponding author: Benmehdi Houcine, Faculty of Sciences and technology, Department of Technology, University of Bechar 08000 Algeria.

Tel: 00213779517854

E-mail: h_ben90@yahoo.fr

Foundation Project: Supported from the Algerian Ministry of the higher education and scientific research, PRU project approved in 2011/2013 under the code F03820100015).

Article history:

Received 5 Apr 2013

Received in revised form 15 Apr, 2nd revised form 29 Apr, 3rd revised form 6 May 2013

Accepted 20 May 2013

Available online 28 June 2013

responsible for allergic or toxic disorders among consumers because of the production of mycotoxins or allergens[2].

Fungi are generally controlled by synthetic fungicides; however, the use of these is increasingly restricted due to the harmful effects of pesticides on human health and the environment[3]. The increased risk of high-level toxic residues in the products and the emergence of pathogens resistant to the products employed, justifies the search for novel active molecules and new control strategies. Thus, there is a growing interest in the research of possible use of the plant extracts for control of the pest and diseases in agriculture which is less harmful to the health and environment[4,5]. Several works have demonstrated in laboratory trials that plants tissues, such as roots, leaves, seeds and flowers possess inhibitory properties against bacteria, fungi and insects[6,7].

Facing these health problems, the use of medicinal plants in herbal medicine has received great interest in biomedical research and is as important as chemotherapy. This because herbs are an inexhaustible source of bioactive natural compounds and other parts of the need for research to better medication therapy by softer without side effects[8]. Medicinal plants are now an endless source of interesting molecules for scientists and industry. Molecules from these plants have similar active ingredients which have specific properties giving them an intrinsic behaviour[9]. A wide spectrum of biological substances extracted from medicinal plants, including oils were tested to replace some of the ways to fight against xenobiotics including fungi. In this section several authors have confirmed the effectiveness of the oils on toxigenic fungi[10–12].

This study was carried out with an objective to investigate *in vitro* the antifungal potency of free fatty acids methyl esters fraction (FAMES) extracts from the seeds oil of *Linum usitatissimum* L. (*L. usitatissimum*). In this context and in a first time, FAMES was separated from the linseed oil, in a second one the antifungal effect of these esters has been investigated against two fungal strains producing aflatoxins and ochratoxin A among other *Aspergillus flavus* (*A. flavus*) and *Aspergillus ochraceus* (*A. ochraceus*).

2. Materials and methods

2.1. Plant material and extract preparation

The *L. usitatissimum* seeds used for the present study were collected in February 2012 in Kenadsa area, Bechar Department, Algeria. The seeds were shade and dried at room temperature for 10 d. The dried seeds part plants were milled to a fine powder in an electrical mill and stored in the dark at room temperature in recipients until required. Samples (100 g) of dried powdered form seed were taken into the Soxhlet apparatus. A piece of cotton is placed at the top and bottom of the apparatus to evenly distribute the solvent

as it drops on the sample during extraction. Extraction was carried out with Petroleum ether for 6 h without interruption by heating around 40 to 60°C. After the extraction, solvent was evaporated on the Buchi–Rotavapor until no odour of solvent remains and finally oil (6.8 g) was collected in a separate beaker for further analysis[12].

2.2. Isolation of ester from fatty acids extract

2.2.1. Saponification of fatty acids

Into a 250 mL round-bottomed flask, fitted with a reflux condenser, place 3.4 g of oiliness residue, ethanol (15 mL), water (15 mL) and sodium hydroxide 3 g. Reflux the mixture for about 45 min. Distill off the ethanol under reduced pressure using a rotary evaporator. Extract the solution with 15 mL of diethyl ether. Acidulate the organic layer with concentrate acid (HCl) then extract it with 20 mL of diethyl ether. Distill off the solvent. Yield: 3.24 g of fatty acids residue[13].

2.2.2. Methyl esterification of fatty acids

Into a 250 mL three-necked flask equipped with a dropping funnel, a sealed stirrer unit a double surface condenser, place 3 g of fatty acids and 25 mL of methanol. Add slowly through the dropping funnel and with vigorous stirring a solution of concentrate sulfuric acid (1 mL). Reflux the mixture for about 2 h. Allow the reaction mixture to reach room temperature and to stand for 2 h, cool the mixture and pour onto 300 g of crushed ice. The aqueous layer was then extracted with chloroform. The organic layer was dried on anhydrous sodium sulfate. The solvent was distilled off. Yield: 1.12 g of methyl esters residue[15,16].

2.2.3. Column separation of methyl ester fraction

The methyl esters of extract (1.12 g) was purified by column chromatography 1150 mm long and 35 mm in diameter, filled with 250 g of silica gel S, subsequently eluted with a mixture of petroleum ether–chloroform (9:1). A total of 10 fractions was collected and combined into two fractions (Frac.1 (0.9 g) and Frac.2 (0.3 g)). Analysis via thin layer chromatography showed that the fraction 1 is pure in comparison with the fraction 2.

2.3. Fungal materials and confirmation of testing strain

The seeds oil extracts were assayed for antifungal activity against the fungal strain *A. flavus* MTTC 2799 and *A. ochraceus* CECT 2092 obtained from biology laboratory at Bechar University. Confirmation of *Aspergillus* genera was realized by micro-culture method described by Wheelis and Dugan[17,18]. Furthermore, confirmation of *A. flavus* species was carried out by Single Spore method using three cultures media: malt extract agar at 25 °C, glycerol nitrate agar (G25N) at 25 °C and Czapek yeast agar at 5 °C and 37 °C. Using the identification keys of Pitt and Hocking[19], observation has

been made after the first and second week. Confirmation of *A. flavus* strains was carried out by inoculation at 25 °C in AFAP medium which give oranges Revers plate. The fungal strains are regularly maintained by subculturing on PDA medium. This fungus was stored in tubes of PDA acidified at 4 °C.

2.4. Determination of percent mycelial inhibition by growth radial technique on solid medium

Selected volumes of 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 µL of FAMES isolated from *L. usitatissimum* seeds oil are placed in test tubes and fill up to 15 mL by solid medium PDAA (*Potatoes Dextrose Agar*) to obtain the following concentrations: 0.7, 1.3, 2.0, 2.7, 3.3, 4.0, 4.7, 5.3, 6.0 and 6.7 µL/mL after agitation, the selected solutions were transferred into a petri plates which were inoculated by the respective spore solution of each fungal strain tested (Agar solution at 0.2%+5% tween 80 and spores of fungal strains). The plates were incubated for 7 d at 25±2 °C. Mycelial radial growth was measured from the third day of incubation[20,21]. The inhibition percentage of mycelial growth was calculated using the following formula: $(PIg = ((DT - D) / DT) \times 100$ where DT is mean diameter of mycelial growth in control and D is mean diameter of mycelial growth in treatment[22].

2.5. Determination of percent mycelial inhibition by biomass technique on liquid medium

Evaluation of biomass liquid medium was achieved by counting of spores number using Malassez in order to obtain the concentration of 10⁶ spores/mL[23]. This technique consists to put different volumes of esters 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 and 100 µL in flasks and completed them with 50 mL of PDBa (Potato Dextrose Broth acidified) in order to obtain the following concentrations: 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 and 2.0 µL/mL. These liquid cultures were sowed with 30 µL of sporal suspension. The flasks were incubated for 14 d at 25±2 °C[24,25]. After filtration, the filter paper was dried at 60 °C during 24 h[26]. Biomass weight formed (P) was determined using the following formula of Swagatica (2012) ($P = P_1 - P_0$, where P₀ is the filter paper weight and P₁ is the filter paper and fungal biomass weight after dryness[27].

2.6. Statistical analysis

All experiments were repeated at least five times. The

experimental data were analyzed statistically by the analysis of variance (ANOVA) under excel 2007.

3. Results

Through the results depicted in Table 1, it appears that the seeds of *L. usitatissimum* gave a good yield of oil (39.96%). On the other hand, our results obtained by isolation methods from fatty acids showed a yield of 37.44% of crude esters this extraction yield is quite similar to the first one. Contrary to these results, the crude ester gave a great efficiency of major esters (80%). On the other hand, the results obtained by identification methods provided that our strains corresponded well to *A. flavus* and *A. ochraceus*.

Table 1

Table 1
Mean yields of isolated esters.

	Oil	Crude esters	Major fraction of esters after Column separation
Weight (g)	6.80	1.12	0.90
Yields (%)	–	37.44	80.00

The antifungal activity recorded in the present study by the inhibition of radial growth on solid medium, revealed that the tested FAMES possess potential antifungal activity against *A. flavus* and *A. ochraceus*. The effect of different concentrations of the FAMES is summarized in Table 2. Indeed, the tested proportions inhibited the growth of fungus even at low concentrations. The potency of the *L. usitatissimum* FAMES was optimal on *A. flavus* more than the second fungi on all tested concentrations. The highest antifungal index was found to be (54.19%) compared to *A. ochraceus* (40.48%) and the least activity recorded on *A. flavus* (46.11%) was observed at 70 µL. In contrast, less antifungal activity was revealed against *A. ochraceus* on almost tested dilutions. Statistical analysis of variance ($P < 0.05$) revealed significant results.

The results obtained from biomass weight on liquid medium showed different and variable fungal weights. These last were almost superior to controls as shown in Table 2. Results analysis of fungal biomass (*A. flavus* – *A. ochraceus*) product under action of our FAMES showed that the biomass were more important than control weights. However, some exception were recorded at certain concentrations (0.4 µL/mL, 1 µL/mL, 1.6 µL/mL) on which inhibition of biomass was perceived (IAF_{0.4 µL/mL}=18.25% ; IAF_{1 µL/mL}=12.15% and IAF_{1.6 µL/mL}=17.89%). Same findings were obtained for *A. ochraceus*. The

Table 2
Antifungal index of FAMES isolated from *L. usitatissimum* tested against *A. flavus* and *A. ochraceus*.

		10 µL	20 µL	30 µL	40 µL	50 µL	60 µL	70 µL	80 µL	90 µL	100 µL
<i>A. flavus</i>	Solid medium	54.19±0.85	53.16±0.91	48.22±0.47	48.62±0.40	51.69±0.40	50.73±0.12	46.11±0.06	49.25±0.33	47.83±0.26	48.88±0.73
	Liquid medium	-10.43±0.13	18.25±0.59	-25.49±0.51	-0.82±0.22	12.15±0.61	-5.20±0.31	-13.95±0.34	17.89±0.14	-16.03±0.31	-11.37±0.63
<i>A. ochraceus</i>	Solid medium	39.17±0.79	29.56±0.47	38.24± 0.83	40.44± 0.14	37.18± 0.55	35.87± 0.45	38.47± 0.78	30.07± 0.83	40.48± 0.12	30.60± 0.64
	Liquid medium	2.90±0.46	-13.23±0.70	-6.45± 0.97	-33.23±0.16	-11.29±0.02	21.61± 0.04	-12.90±0.28	10.87± 0.72	-42.58±0.37	-12.58±0.32

(Growth radial technique on solid medium and Biomass technique on liquid medium). ($P < 0.05$)

weight of biomass decrease in dilutions of 1.2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 1.6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ($\text{IAF}_{1.2 \mu\text{L}/\text{mL}}=21.61\%$; $\text{IAF}_{1.6 \mu\text{L}/\text{mL}}=10.87\%$). Statistical analysis showed that there is no statistically significant difference but *A. ochraceus* was found to be more or less sensitive.

4. Discussion

Fungi are ubiquitous in the environment, and infection due to fungal pathogens has become more common. The genus *Aspergillus* is widely distributed in nature and its species are among the most common destroyers of foodstuffs and grains during storage. It includes species that may damage crops in the field or cause post harvest decay[28]. In addition, the genus produces mycotoxins and studies in the last decade have emphasized its toxicogenic properties. Indeed, the palette adverse effects of mycotoxins on the human and animal health is very extensive and sometimes unknown[29,30]. Besides acute toxic effects or chronic hemorrhagic, immunotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, neurotoxic, teratogenic, or oestrogenic, certain mycotoxins have shown mutagenic and carcinogenic effects in laboratory animals and humans[31].

Over the last decades, concerns were expressed about the increasing prevalence of pathogenic fungi that are resistant and more precisely those producing mycotoxins. But, the problem posed by the high cost and the increased toxic side effects of some synthetic substances coupled with their failure to treat cannot be underestimated. For this reason, this last decade we witness an increased intensive studies of extracts and biologically active compounds isolated from natural plants[32,33]. Facing this situation, the aim of this work was to evaluate *in vitro* the potential antifungal of FAMES extract from seeds oil of *L. usitatissimum* against toxigenic fungi producing mycotoxins such as *A. flavus* and *A. ochraceus* in order to check possible inhibition activity.

Results for determination of oils extraction yields, showed that yield of 39.90% of oil was obtained from seeds part of plant *L. usitatissimum* this value correspond well to Quebec research center (35%–45%) and (Diedrichsen *et al*, 2008) findings (26%–65%)[34]. Preliminary analysis of the results of the isolation of esters from *L. usitatissimum* oil revealed a yield of 37.44% of crude esters which have provided a considerable rate of FAMES (82.80%). These results are in analogy with literature data which confirm the richness of this oil with fatty acids and esters of fatty acids[35].

The obtained antimicrobial results showed a pronounced antifungal activity of FAMES isolated from *L. usitatissimum* seeds oil. These results are in harmony with the work of Lima (2011) and Canales (2011) who showed that the methyl esters of fatty acids are endowed with antibacterial and antifungal capacity[36,37]. Exploitation of the evaluation of antifungal solid medium of FAMES finding, revealed their inhibitory effect against the two fungal strains on all concentrations

tested. Furthermore, we found that the antifungal effect of the FAMES was more pronounced on *A. flavus* than *A. ochraceus* ($\text{IAF}_{10 \mu\text{L}}=54.00\%$, $\text{IAF}_{20 \mu\text{L}}=53.16\%$, $\text{IAF}_{50 \mu\text{L}}=51.69\%$). These results correlate with the work of Yingying[11], who reported that *linum*seeds powder at 6% concentration inhibit completely the development of *A. flavus*. Previous reports have shown that the FAMES provided antibacterial and antifungal activities[36–38]. Chandrasekaran showed that fatty acid methyl esters extracted from halophyte plants exhibited strong antimicrobial activity against micro-organisms pathogenic to human as *A. fumigatus* and *A. Niger*[39]. Nehdi *et al.* and Choi *et al.* have emitted the hypothesis that the antifungal effect was probably due to the predominantly linoleic acid present in linseed oil[40,11].

Furthermore, the biomass in liquid medium technique showed that FAMES have no inhibitory except on some concentrations ($\text{IAF}_{1.2 \mu\text{L}/\text{mL}}=21.61\%$ for *A. ochraceus* and $\text{IAF}_{0.4 \mu\text{L}/\text{mL}}=18.25\%$) for *A. flavus*. Same findings (fluctuation of biomass weights) has been reported by Ozdemir *et al.* and Elsemra *et al*[42,43]. At this stage of the analysis, we have not yet a clear explanation for the perceived difference in the two methods of evaluation of the antifungal activity of our FAMES, but it is sure that this difference does not exclude the antifungal activity. The assumption is that the fractions present in the ester that may be responsible for the antifungal activity by reducing mycelial growth in solid media do not react by the same way in the liquid medium. Otherwise, incubation under agitation might be given a better homogenizing culture medium and an increased chance of contact between the fungus and the bioactive fraction. We believe also that antifungal effect may be due to the abundance of linoleic and linolenic acids in linseed oil[44]. This assumption has been confirmed by Choi *et al*[12].

The results of the present work indicate that the *Linum* FAMES assayed possess antifungal properties which could be used on various diseases whose symptoms might involve fungal infections and storage fungi and food spoilage in food industry field. Further, phytochemical research is needed to identify the active fatty acid responsible for the antifungal effect.

Conflict of interest statement

We declare that we have no conflict of interest.

Acknowledgements

This work received supplied assistance from university of Bechar and the Algerian Ministry of the higher education and scientific research. This work has been funded by a university research project (PRU project approved in 2011/2013 under the code F03820100015). We are great to our co-workers who supplied fungal isolates and provided

useful suggestions and information's for this study.

Comments

Background

A. flavus and *A. ochraceus* are able to deteriorate food, inducing organoleptic and chemical deteriorations with serious risks of intoxications for the consumers. Produced *A. flavus* of aflatoxine group's substances are toxic and carcinogenic (disease X of turkeys and other livestock). *A. ochraceus* produced of the ochratoxine, this mycotoxin is the cause of human renal disease, and easily contaminates the cereal grains stored in the mould.

Research frontiers

The means of fight against the moulds are numerous: A rigorous hygiene, physical agents like the temperature or radiations but cannot be used in a universal way, certain chemicals (fungicidal) can also be used, but harmful for the man, very recently lactic Bacillus and other bacteria can play a determining role. This work is interested has the action of the FAME extradited of the plant: *L. usutatissimum*. Indeed, several work showed that certain parts of the plants has inhibiting properties with respect to the bacteria, mushrooms and insects without side effects.

Related reports

The objective of this study is to evaluate the antiphonic activity of the fatty acids (FAME) of seeds of *L. usutatissimum* Exit of the Bechar (Algérie) area. Methodology is well described, the means implemented make it possible to control an experimental work well on the living organisms: Identification of the moulds and quantification of the activity, the latter was evaluated in terms of percentage of the radial growth on solid medium and by the inhibition of the growth on liquid medium, with respect to two moulds: *Aspergillus F* was shown more sensitive with a rate of 54.19% compared to *A. okraceus* (40.48%), but the results on the biomass seems to be can convincing.

Innovations and breakthroughs

Fatty acids from the plant have antifungal activity may be quite large and the natural products label food preservation, but deeper studies should be conducted to confirm that they do not present a danger to the living; it would be interesting to see how they are working on these foods (spray coating ...).

Applications

The presence of producing toxin moulds must be taken with the serious one, they are carcinogenic molecules even has low dose since, not or with difficulty metabolize and thus accumulates in the organization, the prevention is essential in the silos and other places of storages which must be refractory mediums with the development of mushrooms.

This plant and well of others of the area must undergo a screening for their metabolites have fine to replace: Chemicals and other radiations for the conservation of food.

Peer review

This contribution can be a remedy for the gravity and the abundance of the contamination of the foodstuffs. Indeed, FAMES of seeds of *L. usutatissimum*, exit of the Bechar (Algeria) area, showed an appreciable activity about (54.19% and 40.48%) successively on *Aspergillus F* and *A. oracles*. This antifungal capacity can be due to the abundance of the linoleic and linolenic acids in the linseed oil which seems promising to treat the fungi infections, the mushrooms of storage and deterioration of food in the field of food industry.

References

- [1] Yanes LR, Torres PI, Guevara–Gonzales RG, Hernandez–Zul MI, Quijano–Carranza JA, Rico–Garcia E. The effect of climate change on plant diseases. *Afr J Biotechnol* 2012; **11**(10): 2417–2428.
- [2] Dellavalle PD, Cabrera A, DiegOA, Larranaga P, Ferreira F, Rizza MD. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean J Agric Res* 2010; **71**(2): 231–239.
- [3] Hermiche R, Daniela B, Dujardin B, Bergman P, Herman F. EFSA's contribution to the implementation of the EU legislation on pesticides residues in food. *EFSA J* 2012; **10**(10): s(1011).
- [4] Logardia T, Ramdani M, Figueredo G, Chalachat JC, Chalard P. Essentiel oil composition and antimicrobial activity of *Genista microcephala* Coss. et Dur. *Int J Med Arom Plants* 2012; **2**(1): 75–79.
- [5] Nwosu MO, Okafor JI. Preliminary studies of the antifungal activities of some medicinal plants against basidiobolus and some other pathogenic fungi. *J Ethnopharmacol* 2000; **72**(1–2): 111–117.
- [6] Thembo KM, Vismar HF, Nyazema NZ, Gelderblom WCA, Katerere DR. Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. *J Appl Microbiol* 2010; **109**(4): 1479–1486.
- [7] Benraiba N, Djaziri R, Bellakhdar W, Belkacem N, Kadiata M, Malaisse WJ, et al. Phytochemical screening and free radical scavenging activity of *Citrullus colocynthis* seeds extracts. *Asian Pac J Trop Biomed* 2013; **3**(1): 35–40.
- [8] Dramane S, Mamidou KW, Kamanzi K. Evaluation of antimicrobial and free radical scavenging activities of some bioactive taxons from cote d'ivoire. *Eur J Sci Res* 2010; **40**(2): 307–317.
- [9] Evon MP. New biorefinery process of sunflower whole plant by splitting thermo–chemical–mecano twin–screw extruder: a study of the aqueous lipid extraction and shaping of a raffinate by thermomoulage biomaterials. *INRA Toulouse France* 2008: 12–25.
- [10] Ziyada AK, El Hussein SA. Physical and chemical characteristics of *Citrullus lanatus* var. *colocynthis* seed oil. *J Phys Sci* 2008; **19**(2): 69–75.
- [11] Yingying X, Clifford H, Charlene WH, Frank M. Fungistatic activity of flaxseed in potato dextrose agar and a fresh noodle

- system. *Int J Food Microbiol* 2008; **121**: 262–267.
- [12] Choi GJ, Jang KS, Choi YH, Yu JH, Kim JC. Antifungal activity of lower alkyl fatty acid esters against powdery mildews. *Plant Pathol J* 2012; **26**(4): 360–366.
- [13] Marzouk B, Marzouk Z, Decor R. Antibacterial and anticandidal screening of tunisian *Citrullus colocynthis schard* from medecine. *J Ethnopharmacol* 2009 ; **125**: 344–349.
- [14] Bruneton J. *Pharmacognosy – medicinal plants phytochemistry*. 4th ed. Lavoisier (Paris): Technic and Documentation; 2009.
- [15] Angé C, Bourget E. *Purification and analysis of organic compound*. 4th ed. Ellipses: Laboratory Techniques; 2008, p. 156.
- [16] Peter K, Velhardt C, Neil ES. *Treatise of organic chemistry*. 5th ed. De Boeck; 2009.
- [17] Wheelis M. *Principles of modern microbiology*. Canada: John and Barlett Publishers; 2008, p. 293–300.
- [18] Dugan FM. *The identification of fungi: an illustrated introduction with keys glossary and guide to literature*. Portland: Book News, Inc.; 2006.
- [19] Pitt JI, Hocking AD. *Fungi and food spoilage*. 3rd ed. London: Springer Science; 2009.
- [20] Soro S, Ouattara D, Guédé NZ, Coffi K, Edouard KN, Daouda K, et al. Inhibitory effect *in vitro* and *in vivo* extract powder and essential oil of *Xylopiia Aethiopica* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae) of *Fusarium oxysporum* f. *radicis*–sp *Lycopersici* (Forl), parasite fungus cultures of tomato. *Eur J Sci Res* 2010; **39**(2): 279–288.
- [21] Kra KD, Diallo HA, Kouadio YJ. Antifungal activity of the extract of *Chromolaena odorata* (L.) King & Robins on two isolates of *Fusarium oxysporum* (EF Sm.) Responsible for lethal yellowing leaves of banana. *J Appl Biosci* 2009; **24**: 1488–1496.
- [22] Singh P, Kumar A, Dubey NK, Gupta R. Essential oil of *Aegle marmelos* as a safe plant–based antimicrobial against postharvest microbial infestations and aflatoxin contamination of food commodities. *J Food Sci* 2009; **74** (6): 302–307.
- [23] Swagatika R, Tewari SN. Fungitoxic spectrum of Amalab–a against fungal pathogens in rice under *in-vitro*. *J Biopest* 2012; **5**(2): 161–167.
- [24] Tubajika KM. Efficacy of alkyl dimethyl benzyl amonium chlorid on supression of *Physalospora vaccinii* in laboratory assays. *J Food Prot* 2006; **69**(10): 2460–2464.
- [25] Eman RH, Abdelsayed MHF, Shehata SH. Suppression of fusarium wilt of watermelon by biological and chemical control. *J Appl Sci Res* 2009; **5**(10): 1816–1825.
- [26] Dhandhukia PC, Thakkar VR. Standardization of growth and fermentation criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for production of jasmonic acid. *Afr J Biotechnol* 2007; **6**(6): 707–712.
- [27] Badshah H, Rizawana AQ, Javed K, Farman U, Fahad S, Fazian U et al. Pharmacological screening of *Morchelle esculenta* (L.) Pers., *Calavatia gigantean* (batsch ex Pers.) Lloyd and *Astraeus hygrometricus* Pers., mushroom collected from south Waziristan FATA. *J Med Plant Res* 2012; **6**(10): 1853–1859.
- [28] Sun J, Awakawa T, Noguchi H, Abe I. Induced production of mycotoxins in an endophytic fungus from the medicinal plant *Datura stramonium* L. *Bioorg Med Chem Lett* 2012; **22**(20): 6397–6400.
- [29] Brochard G, Le Bacle C. Mycotoxins in the workplace. Document for the doctor of labour. Studies Department and medical assistance. *INRS P* 2009; **119**: 299–323.
- [30] Cynthia AC, Suretha DK, Judith ZP, Mulunda M, Mary AE, Dutton MF. Fungal and mycotoxin of south African commercial maize. *J Food Afri Environ* 2012; **10**(2): 296–303.
- [31] Korhonen A, Seaghdha OD, Silins I, Sun L, Hogberg J, Ulla Stenius. Text mining for literature review and knowledge discovery in cancer risk assessment and research. *PLoS One* 2012; **7**(4): e33427.
- [32] Mabrouk MI. Synergistic and antibacterial activity of six medicinal plants used in folklore medicine in Egypt against *E. coli* O157: H7. *J Appl Sci Res* 2012; **8**(2): 1321–1327.
- [33] Elamathi R, Kavitha R, Kamalakannan P, Deepa T, Sridhar S. Preliminary phytochemical and antimicrobial studies on the leaf of *Ecbolium viride*. *World J Pharm Biol Sci* 2012; **2**(1): 5–10.
- [34] Diedrichsen A. Comparison of genetic diversity of flax (*Linum usitatissimum* L) between *Canadian cultivars* and a world collection. *Plant Breeding* 2008; **120**: 360–362.
- [35] Murwan KS, Alamin AA, Sulafa HN, Sabir AKA. Composition and quality of six refined edible oils in khartoum state Sudan. *ARPN J Sci Technol* 2012; **2**(3).
- [36] Lima B, Lopez S, Luna L, Agüero MB, Aragon L. Essential oils of medicinal plants from the central andes of Argentina: Chemical composition and antifungal, antibacterial and insect–repellent activities. *Chem Biodivers* 2011; **8**: 924–936.
- [37] Canales M, Hernández T, Rodríguez–Monroy MA, Flores CM, Jiménez–Estrada M, Hernández LB, et al. Evaluation of the antimicrobial activity of *Acalypha monostachya* Cav. (Euphorbiales: Euphorbiaceae). *Afr J Pharm Pharmacol* 2011; **5**(5): 640–647.
- [38] Piyusha SS, Vijay KRS, Gauri SS, Vidya SR. Medicinal value of mangroves and its antimicrobial properties a review. *Cont J Fish Aquat Sci* 2012; **6**(1): 26–37.
- [39] Shen Y, Sun YF, Sang Z, Sun C, Dai Y, Deng Y. Synthesis characterization antibacterial and antifungal evaluation of novel monosaccharide esters. *Molecules* 2012; **17**: 8661–8673.
- [40] Chandrasekaran M, Senthilkumar A, Venkatesalu V. Antibacterial and antifungal efficacy of fatty acid methyl esters from the leaves of *Sesuvium portulacastrum* L. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; **7**: 75–80.
- [41] Nehdi IA, Sbihi H, Tan CP, Al Resayes SI. Evaluation and characterisation of *Citrullus colocynthis* (L.) Schard seed oil: comparison with *Helianthus annuus* (sunflower) seed oil. *Food Chem* 2013; **136**(2): 348–353.
- [42] Ozdemir H, Kara MI, Erciyas K, Ozer H, Ay S. Preventive effects of thymoquinone in a rat periodontitis model: a morphometric and histopathological study. *J Periodontal Res* 2012; **47**(1): 78–80.
- [43] Elsemra AI, Shama SM, Akila SH, Nessrine HY, Mervat SY, Sawssan MA. Effect of treatment with mold inhibitors on plant growth of corn and some nutritional components of stored grains, infected with *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticilloides*. *eSci J Plant Pathol* 2012; **01**: 6–13.
- [44] Mueller K, Eisner P, Yoshie–Starc Y, Nakada R, Kirchhoff E. Functional properties and chemical composition of fractionated brown and yellow linseed meal (*Linum usitatissimum* L.). *J Food Eng* 2010; **98**(4): 453–460.

Full Length Research Paper

Viscosimetric study and synergistic antifungal activity of oils extract from three Algerian medicinal plants against toxigenic *Aspergillus*

A. Amrouche^{1,2}, H. Benmehdi^{1,3*}, S. Bedjaoui⁴, H. Dalile³, A. khelif¹, k. Fellah¹, I. Boublenza², H. Lazouni², A. Moussaoui¹ and D. Chabane sari²,

¹Laboratory of Plant Resource Development and Food Security in Semi Arid Areas, South West of Algeria, University of Bechar, Algeria.

²Laboratory of Natural Products Research (LAPRONA) University of Tlemcen, Algeria.

³Department of Technology, University of Bechar 08000 Algeria.

⁴Laboratory of macromolecules University of Tlemcen 13000 Algeria.

Accepted 17 October, 2012

Oils extracted from seeds of three medicinal plants used in Algerian folk medicine (*Citrullus colocynthis*, *Nigella sativa* and *Linum usitassimum*), were tested for their antifungal synergy against one strain of *Aspergillus flavus* toxin (*A. flavus* MTTC 2799) by the method of radial growth on solid medium Potatoes Dextrose Agar (PDA). Antifungal results revealed that all oils tested at the concentration 1/5000 inhibited the growth of the studied fungus, where the best antifungal potency was observed for the *L. usitassimum* seed oil. The values of antifungal indices (55.65, 48.65, 40.54) were recorded, respectively for *L. usitassimum* oil, *C. colocynthis* oil and *N. sativa* oil at concentrations of (1/5000, 1/500 and 1/2000). The results of the synergistic antifungal activity obtained by oils combination revealed that *L. oil/C. oil* showed the best antifungal effect (54.19%) before the *L. oil/C.oil/N. oil* system with 48.76% of inhibition. In order to explain the synergistic effect and the best behavior of oils, especially determination of optimal concentrations C* (C star) needed for antifungal synergistic activity, viscosimetric investigation was carried out at room temperature and at several concentrations.

Key words: Viscosity, oil carbon chain, synergistic antifungal activity, oils, *Aspergillus flavus*.

INTRODUCTION

Fungal contamination is one of the main causes of deterioration of food, especially after the discovery of mycotoxins produced by these micro-organisms that only accentuated the concerns of farmers, industrialists, scien-

tists and simple consumer (Tahani and Elamrani, 2008). Real adversaries are subtle; mold inoculum is quiet, hidden and dormant and yet capable of producing very harmful and even catastrophic effects when conditions become favorable. Opponents are even more subtle when the visible damage to raw materials have been erased by the processes of transformation, by removing the visible signs of mold activity without eliminating the toxic principles provided, and often very stable, which

*Corresponding author. E-mail: h_ben90@yahoo.fr.

may have been formed before and at the same time preventing any search for correlation between the presence of mold and mycotoxin risk (Bejaoui, 2005). Indeed, faced with these food hazards and the emergence of a sense of insecurity, consumers are increasingly demanding healthier products whose quality and food security are guaranteed (Canadas, 2006).

Today, the use of medicinal plants in phytotherapy received a great interest in biomedical research and is as important as chemotherapy. This renewed interest is that medicinal plants are an inexhaustible source of natural compounds and other bioactive, and share the need to search for better medications for milder therapy without side effects (Yakhlef et al., 2011). The antimicrobial properties of medicinal plants depend on the presence of various bioactive agents belonging to different chemical classes (Bouzouitta, 2008).

Recently, numerous studies have been focused on antifungal activity of the oils extracted from medicinal plants because the scientific evidence derived from experimental studies confirm the amplitude spectrum of antifungal activity confined to these class of compounds (Ziyada et al., 2008; Yingying et al., 2008; Dale et al., 2004; Marzouk et al., 2009). In the same route, the results collected from our previous study revealed that the oils of *C. colocynthis*, *L. usitatissimum* and *N. sativa* reduced the growth of *A. flavus* MTTC 2799, producing aflatoxin at various concentrations (Amrouche et al., 2011). That is why we focused our attention on the search of eventual synergistic effects from different combinations of the *L. usitatissimum*, *C. colocynthis* and *N. sativa* oils against *A. flavus* strain and to introduce the viscosity parameter in order to explain the synergistic potency of these oils.

MATERIALS AND METHODS

Collection of plants material

The *C. Colocynthis* seeds used for the present study were collected in December 2010 in Beni Abbes area (Bechar). Whereas, the *L. usitatissimum* and *N. sativa* seeds were purchased from local market of Bechar Department, Algeria. The seeds were shade dried at room temperature for 10 days. The dried seeds were milled to a fine powder in an electrical mill and stored in the dark at room temperature in recipients until required.

Extraction of the oils

The finely powdered seeds materials (15 g) of each plant were submitted to oils extraction with petroleum-ether (180 mL) using soxhlet apparatus for 6 h. The different extracts obtained were subsequently concentrated under reduced pressure to give the

corresponded oils. The corresponding physicochemical parameters of the oils were performed according to AFNOR (1988).

Viscosity measurement

Viscosity was measured with a capillary viscosimeter ubbelohdschott Gerat AVS400 (Bock et al., 1988). The temperature is kept constant by a thermostat (25 ± 0.1) °C. Dilution of oil solutions was performed manually. The viscosity measurement is based on the determination of the flow time of a volume of the solution through a capillary length of "l" and diameter "a".

Fungal material and confirming of testing strain

The seeds oil extracts were assayed for antifungal activity against the fungal strain *A. flavus* MTTC 2799 obtained from biology laboratory at Bechar University. Confirmation of *Aspergillus* genera was performed by micro-culture method described by Haris (1989) and Barnett (1972). Furthermore, confirmation of *A. flavus* species was carried out by Single Spore method using three cultures media: Malt extract agar (MEA) at 25°C, Glycerol Nitrate Agar (G25N) at 25°C and Czapek yeast agar (CYA) at 5 and 37°C. Using the identification keys of Pitt (1973), observation has been made after the first and second week. Confirmation of *A. flavus* strains was carried out by inoculation at 25°C in Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP) medium which gave oranges Revers plate. The fungal strain is regularly maintained by sub-culturing on PDA medium. Conservation of the strain was carried out on tube of acidified PDA at 4°C.

Determination of percent mycelial inhibition by growth radial technique on solid medium

The final culture of fungal strain was carried out on potato dextrose agar medium (PDA) supplemented oils in different proportions. To obtain a homogeneous distribution of oil and to maximize the contact germ/compound, oils subject of this investigation were used as emulsions to be able to handle as solutions. The agar (0.2%) was chosen as the emulsifying agent because it is devoid of any interaction on the activity of the used oils (Remmal et al., 1993). Using the protocol described in Remmal's report, the different dilutions were prepared in a solution of agar in sterile distilled water for different concentrations of oil, and then they were added to the culture medium acidified potato dextrose agar (PDA acidified) contained in the tubes (Remmal et al., 1993). The mother solution of oil must be at 1/10; it was prepared in a solution of 0.2% agar.

In order to test the synergistic antifungal effect, mother solution of studied oils was prepared from 1.5 ml of each oils and 13.5 ml of potato dextrose agar medium, then different oils system were prepared in various concentrations (1/100, 1/250, 1/500, 1/1000, 1/2000, 1/3000, 1/5000). The tubes were agitated in vortex mixer and the contents are poured into Petri dishes. Note that for each dilution, five dishes are prepared. The inoculation was made from a spore suspension adjusted to 10^5 to 10^6 spores by counting on a Malassez slide. Aseptically, a drop was deposited on the surface of the culture medium. Finally, incubation was performed at 28 ± 4 °C for 3 to 14 days. After incubation and taking into account the growth of the witnesses, the diameters of the mycelia formed were measured to calculate the antifungal index using the formula $ID = (1$

Table 1. Physico-chemical characterization of oils.

Oils	<i>C. colocynthis</i>	<i>L. usitatissimum</i>	<i>N. sativa</i>
Extraction yield (%)	18	39.96	33.71
Color	Light yellow	Yellow straw	Brown green
Physical characterization			
Density	0.9087	0.9319	0.921
Refractive index (20 °C)	1.474	1.4595	1.4720
Freezing point (°C)	-6	-4	-7
Chemical characterization			
Saponification value (mg KOH/g)	219	191	195
Iodine values	86	192	126
Insaponifiable matter (%)	2.26	1.7	3.47
Characteristics of alteration			
Acide value (%)	3.64	3.08	5.42
Acidity (%)	1.83	2.03	3.81
Peroxide value (meq/kg)	1.17	4.74	6.02

Table 2. Antifungal index values of the different tested oils.

Tested oils	1/100	1/250	1/500	1/1000	1/2000	1/3000	1/5000
<i>Colocynthis oil (C. oil)</i>	42,12	45,27	48,65*	37,61	39,05	38,51	41,22
<i>Lin oil (L. oil)</i>	45,97	46,41	50,53	48,17	53,47	50,24	55,65*
<i>Nigela oil (N. oil)</i>	38,73	34,68	32,57	34,04	40,54*	35,59	38,75
<i>C.oil/L.oil</i>	32,43	26,32	28,38	28,38	40,54	54,19*	41,75
<i>C.oil/N.oil</i>	33,78	36,49*	25,68	25,68	26,35	27,03	26,35
<i>N.oil/L.oil</i>	22,97	21,62	22,63	23,65*	20	21,62	23,51
<i>C.oil/L.oil/N.oil</i>	38,16	47,97	40,95	47,97	44,35	45,27	48,76*

(*): Values of the best antifungal index.

- $\text{Da} / \text{Db} \times 100$. Where Da: diameter of the growth area of the test, Db: diameter of the growth area of the samples (Singh et al., 2009).

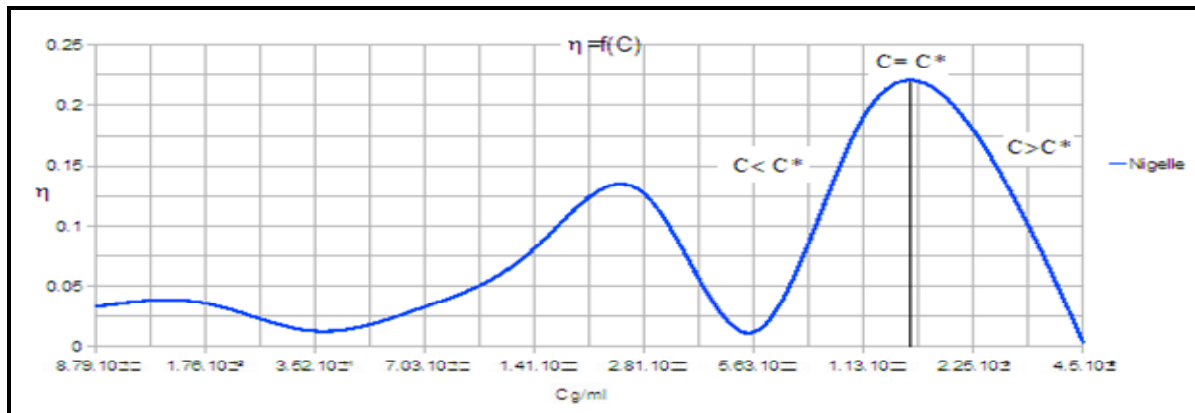
RESULTS

Physico-chemical characterization of oils covered the determination of quality and the alteration criteria. The values obtained were compared to those given by the Codex Alimentarius (1996). The results depicted in Table 1 present the profile of physicochemical oils tested. The exploitation of these results shows variability in the extraction yield (23, 39.96 and 33.71%), respectively for *C. Colocynthis*, *L. usitatissimum* and *N. sativa* oils. On the other hand, from Table 2, we observed high iodine values (86, 192, 126), respectively for *C. Colocynthis*, *L. usitatissimum* and *N. sativa* oils. These physico-chemical

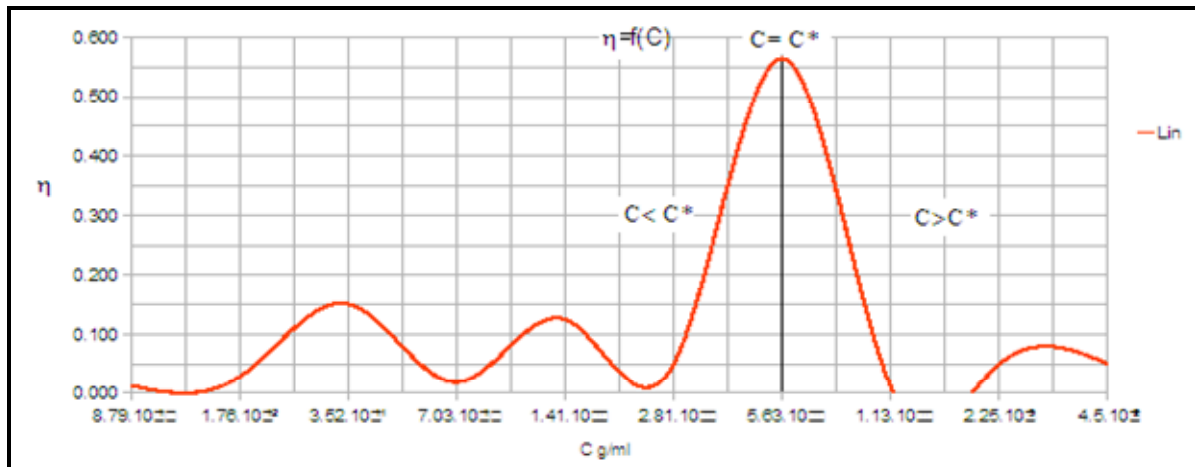
data confirmed well the best behaviour of the oils chain carbon and their ability to bind the iodine molecules.

As outlined in the curves a, b and c, the viscosimetric investigation of the studied oil allowed us to find the optimal concentration of each oil necessary to produce the synergistic antifungal activity. The values of the oils concentrations were found $C_1^* = 1.5 \cdot 10^{-3}$ g/ml, $C_2^* = 5.63 \cdot 10^{-6}$ g/ml and $C_3^* = 1.41 \cdot 10^{-8}$ g/ml, respectively for *N. sativa*, *L. usitatissimum* and *C. Colocynthis*. Furthermore, curves d, e, f and g showed the profile of the oils behaviour during the synergistic effect (Figure 1).

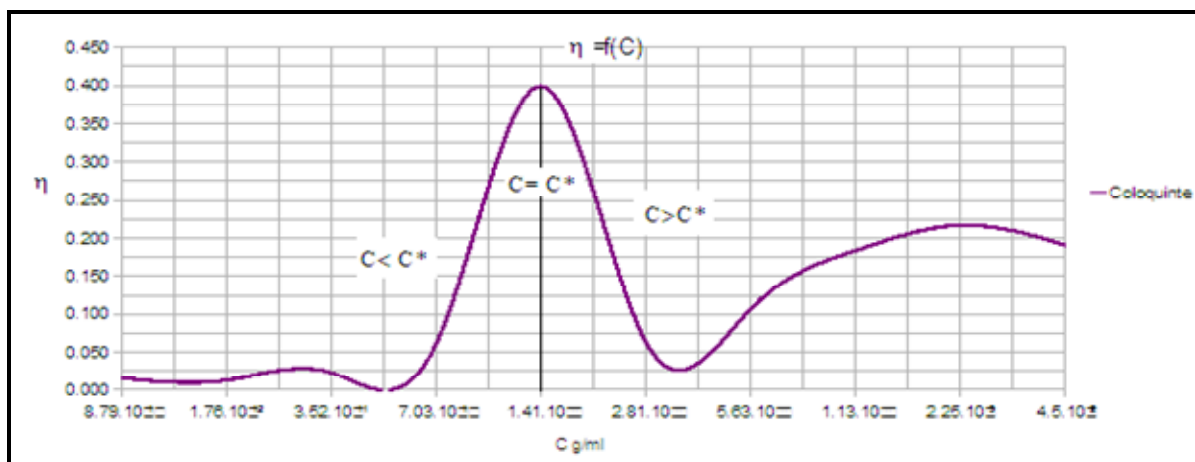
All oils evaluated in this work exhibited more or less antifungal potency against toxigenic strain *A. flavus*. The results obtained by the method of Remmal et al. (1993) pronounced the antifungal activity of these oils. Indeed, growth retardation of the strain was generally perceived



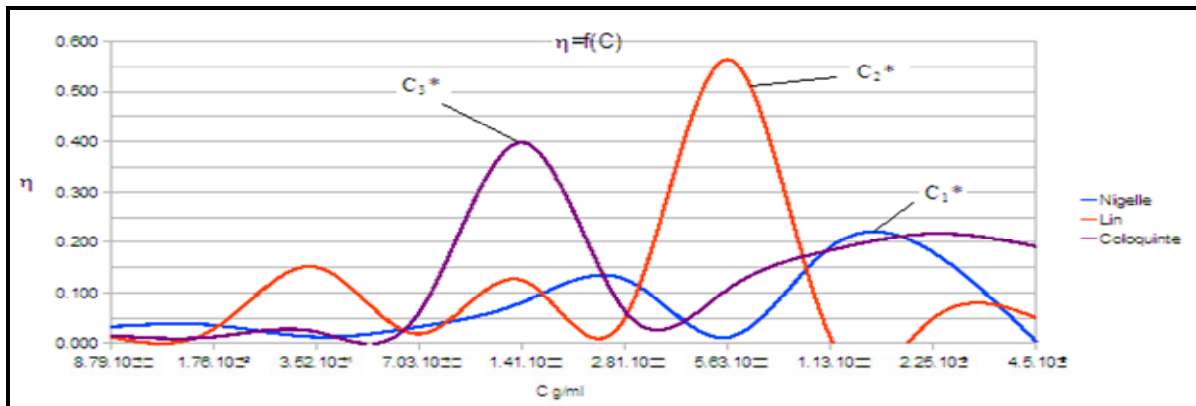
(a)



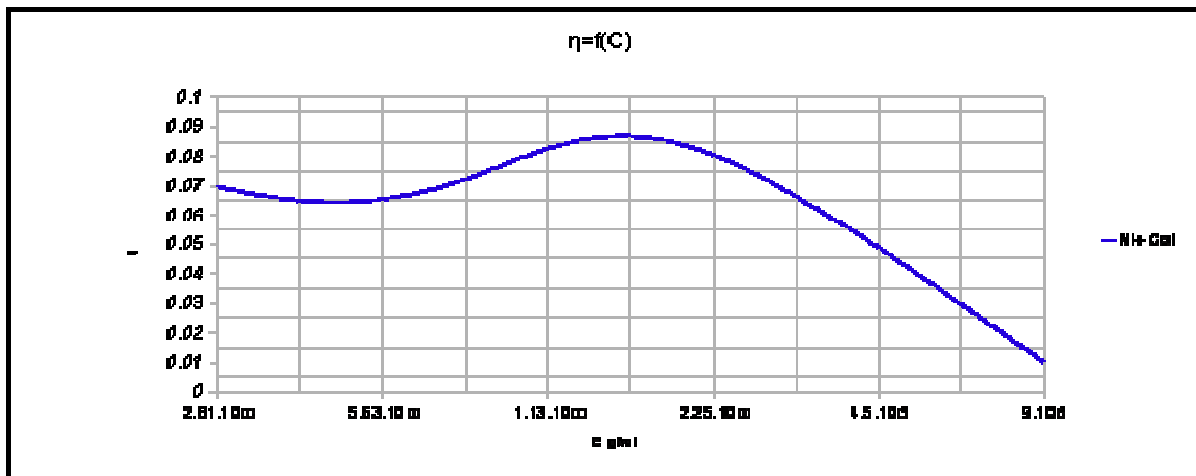
(b)



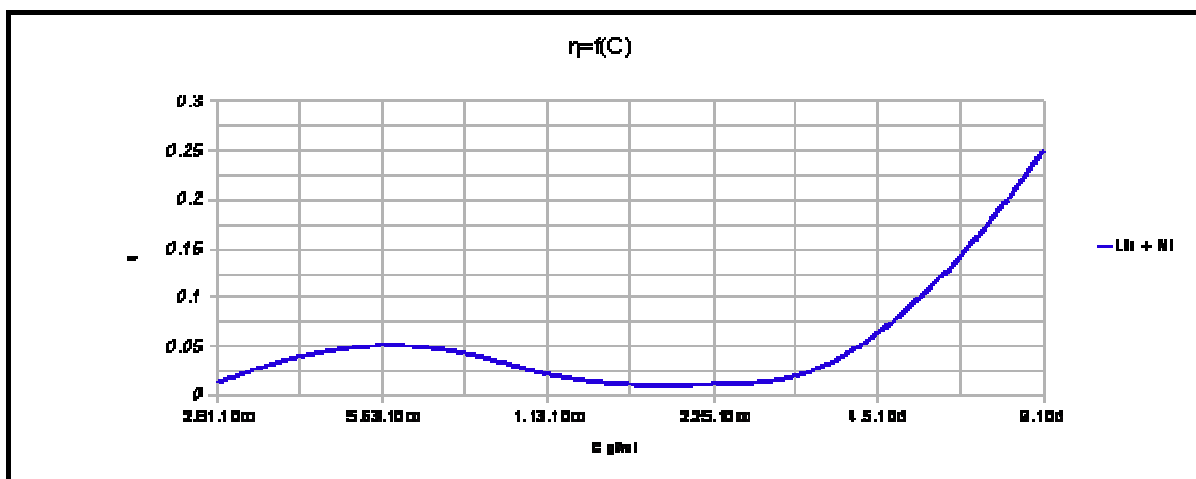
(c)



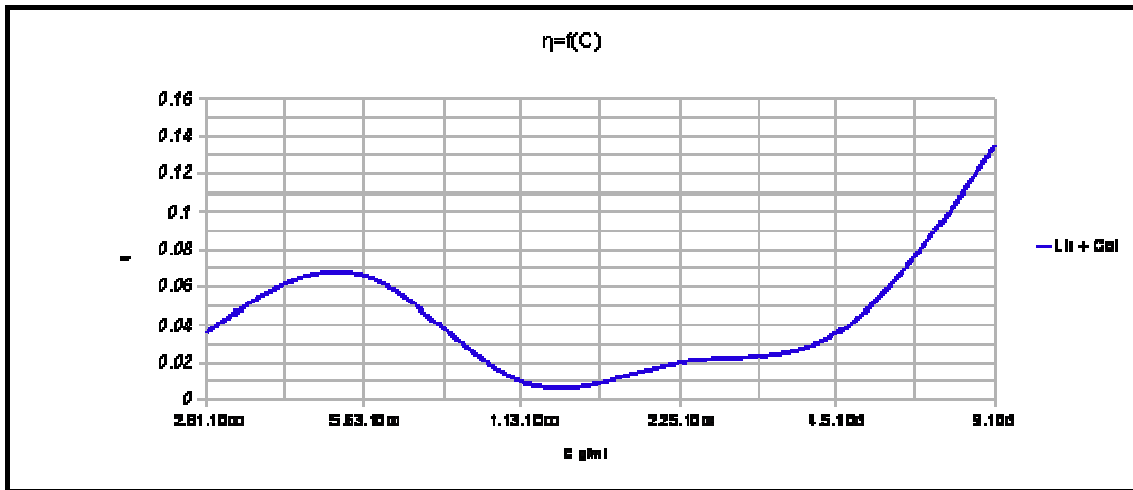
(d)



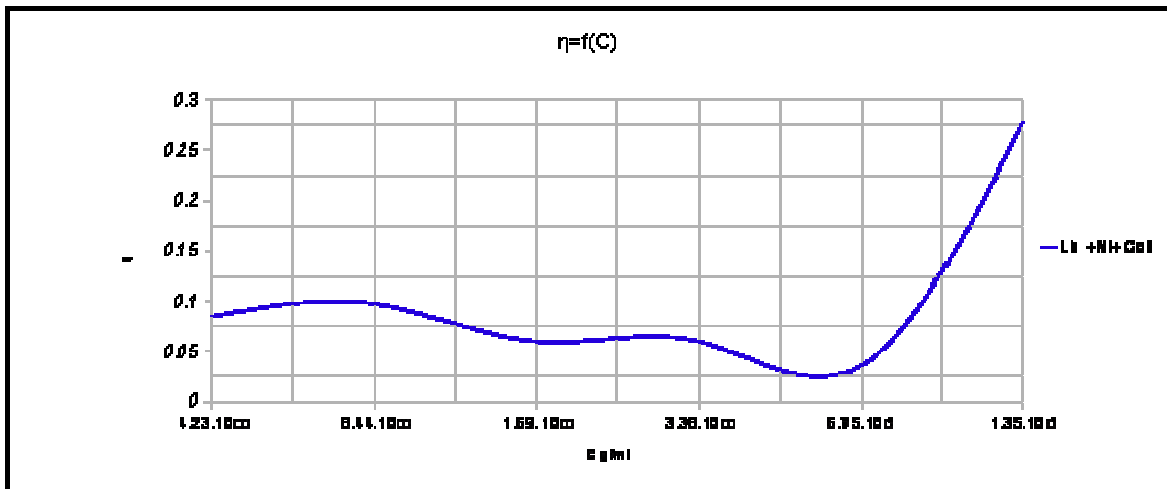
(e)



(f)



(g)



(h)

Figure 1. Variation of specific viscosity with concentration ($\eta_{sp} = f(C)$) for different oils systems. (a) $\eta_{sp} = f(C)$ (g/ml) ($C_1^* = 1.5 \cdot 10^{-3}$ g/ml); (b) $\eta_{sp} = f(C)$ (g/ml) ($C_2^* = 5.63 \cdot 10^{-6}$ g/ml); (c) $\eta_{sp} = f(C)$ (g/ml) ($C_3^* = 1.41 \cdot 10^{-8}$ g/ml); (d) $\eta_{sp} = f(C)$ (g/ml) for the three oils; (e) $\eta_{sp} = f(C)$ (g/ml) synergy (N. oil - C. oil); (f) $\eta_{sp} = f(C)$ (g/ml) synergy (N. oil - L. oil); (g) $\eta_{sp} = f(C)$ (g/ml) synergy (L. oil - C. oil); (h) $\eta_{sp} = f(C)$ (g/ml) synergy for the three oils.

to *A. flavus* merger (1/2000 and 1/5000) at 6th day of incubation, with an optimum concentration of 1/5000 for all oils. As seen in Table 2, we observed that the *L. usitatissimum* oil was shown to be the most potent against the fungus, with inhibition of 55.65%.

The oil of *C. colocynthis* with indices displayed antifungal means (37.61 to 48.65) at concentration (1/500) during the 4th day of incubation. For *N. sativa*, antifungal indices varied between of (40.54 to 32.57) at

the concentration (1/2000) during the 5th and 6th day of incubation and was found to be less potent than the other oils.

The evaluation tests of the antifungal effect by synergistic action performed by different oils combination formulas, showed at least a more efficacy of these oils. The combination of oils in systems (C. oil - L. oil) and high and less potency values of about 54.19 and 23.65% after the 6th and 5th days of incubation. Besides, the

comparison of antifungal indices collected from the different formulas of synergy showed that (C. oil - L. oil) system had the best antifungal effect against *A. flavus* strain with value of about 54.19% at concentration of (1/3000) after the 9th days of incubation. Indeed, the combinations of L. oil and N. oil and C. oil - N. oil showed synergistic antifungal effect with value of 23.65 and 36.49%. As observed in Table 2, the combining formula of the three oils (C. oil - N. oil - L. oil), showed a decrease of the antifungal effect with value of 48.76% at the concentration of (1/5000).

DISCUSSION

Preventing contamination of food by mold and mycotoxins is a major challenge for stakeholders in the food chain (Duris, 2000). Various strategies may exist to try to limit fungal growth and mycotoxin production in the field, at harvest and during storage (Bejaoui, 2005). In spite of the precautions taken to prevent the presence of fungal flora and their toxins from food, accidents still occur because there is no food safety to guarantee zero risk (Canadas, 2006).

Plants are currently a priority source for searching for new biologically active substances, their contents and the chemical nature of their constituents confers great application prospects. A wide spectrum of biological substances extracted from medicinal plants, including oils, was tested to replace some ways to fight against xenobiotics, including fungal. In this section, numerous investigations have confirmed the effectiveness of oils on toxigenic strains of fungi (Ziyada et al., 2008; Yingying et al., 2008; Dale et al., 2004; Marzouk et al., 2009).

In continuation of work done on assessing the antifungal activity of oils extracted from seeds of *C. colocynthis*, *L. usitatissimum* and *N. sativa*, we aimed to test the eventual synergy between these oils, to assess the ability to inhibit or remove the toxigenic strain *A. flavus*.

The analytical control of oils based on determination of chemical indices (values given in Table 1) showed that the values are in agreement with the codex norms'. In fact, the refraction index values of C. oil, L. oil and N. oil were found to be 1.474, 1.480 and 1.472. According to Ollé (2002) data, at intervals (1.472 to 1.480), the oils are rich in fatty acids such as oleic and linoleic acids. Besides, Schafferman et al. (1998) and Dale et al. (2004) confirmed that *C. colocynthis* oil with refraction indice (IR= 1.474) is rich in linoleic acid.

The saponification values of oils (219, 191 and 195) mg_{KOH}/g, respectively for C. oil, L. oil and N. oil, were superior to the codex standards. This result may be an indication of the presence of short carbon chain of fatty

acids (Ollé, 2002). From our finding, iodine values of our samples exceeded the standard requested by codex norms; this may be an index on chains moderately rich in unsaturated fatty acids (karleskind, 1992). As seen in Table 1, we observed high values of iodine number which confirmed well the best behaviour of the oils chain carbon and their ability to bind the iodine molecules. This finding correlated well with the viscosimetric data described. From Table 1, we observed also that the peroxide value of oils was less than the standard of 10 meq O₂/kg oil.

The evaluation of the antifungal potency of oils tested separately showed a satisfactory antifungal effect. The oils efficacy was ordered as follows: *L. usitatissimum*, *C. colocynthis* and *N. sativa*. Determination of antifungal index for L. oil, C. oil and N. oil, respectively gave values (55.65, 48.65 and 40.54). These results are in agreement with findings of Yingying et al. (2008) who demonstrated that the seeds powder of *L. usitatissimum* (6%) inhibit completely the mycelial growth of *A. flavus*. Dale et al. (2004) believed that the antifungal effect could be due to the action of α -linolenic acid present in this oil.

The oil of *C. colocynthis* produced also antifungal efficacy but with less index than *L. usitatissimum*. The obtained results confirmed the reports of Marzouk et al. (2009) and Belsem et al. (2009) who reported the antifungal activity of this oil, which was believe to be due to unsaturated fatty acids. Finally, *N. sativa* seed oil gave slight antifungal index (16.44), where several workers confirmed the effectiveness of some *A. Niger* strains which inhibit completely this fungi (Al Jabre et al., 2005). This action was attributed to thymoquinones present in this oil.

In order to improve the antifungal effect, combination of the three oils in various systems; (L. oil -C. oil), (L. oil - N. oil), (C. oil - N. oil) and (L. oil - C. oil - N. oil) were carried out. Unfortunately, the different formulas have not pronounced the desired results. The association of oils (L. oil - C. oil), (L. oil - N. oil) and (C. oil - N. oil) gave antifungal index (54.19, 23.65, 36.49), respectively, besides, the association of three oils (L. oil - C. oil - N. oil) enhanced the antifungal indice (48.76). These indices are the same as those obtained by the use of each oil separately.

Employing viscosity investigation helped us to explain the oils behaviour used separately or in several synergistic formulas. The concentrations required for antifungal effect corresponded well to optimal concentration (C*). At these concentrations, the oils carbon chain covered the space of solution (Flory, 1971). According to the results of Benmansour et al. (2003), the chains are impenetrable and form a temporary micelles at high concentrations (C > C*). Figure 2 showed the behaviour of oils in different solution systems (Doi and Edwards, 1986). The viscosimetric behaviour design of the studied oils allowed

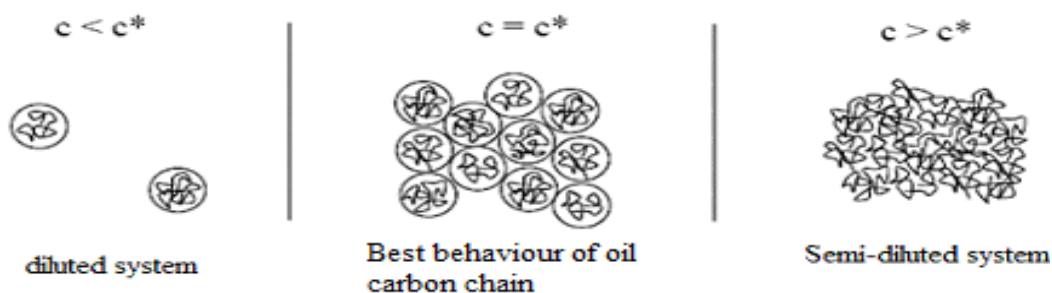


Figure 2. Behaviour of oils carbon chain at different concentrations.

us to highlight the area of ideal concentration for optimal synergistic antifungal activity and therefore understand the behavior of these oils together to advocate the critical micelle concentrations for a possible synergistic antifungal activity. In this field and as observed in Figure 2, the discussion must be in the area of ($C = C^*$), in this area, the oil carbon chain is more spread and flexible, and act in better manner than other ranges. These findings confirmed well the reports of Regalado et al. (1999) and Benmansour et al. (2003) who showed that the effect of longer chains increased the viscosity in an exponential manner (Allouche, 2003). This result showed clearly the importance of the viscosity parameter which informed us about the variations of conformations of macromolecules in solution.

Indeed, this technique provided the presence of intra- or intermolecular associations between oils chains. For our best knowledge, it is important to underline that the study of the synergistic effect of the oils was not carried out through employment of the best behavioural oil carbon chain at C^* . This study open the way for further investigations to test the synergistic effect of the studied oils using the obtained C^* values, identify, purify the active molecules, determine the antifungal activity and elucidate the mechanism of antifungal purified molecules.

Conclusion

The results obtained are only the first step of the synergistic antifungal activity of the studied oils, further studies should be performed to confirm or refute the effectiveness of these oils on the reduction of fungal flora. From the viscosimetric behaviour investigation, the optimal synergistic antifungal activity of the oils used must be and will be tested at concentration of C^* . At the end, fine analytical study on the composition of these oils is more than necessary to search on the possible

proportions of these oils for synergistic antifungal potency.

REFERENCES

- AFNOR (1988). Corps gras, grains oléagineuses, produits dérivés, Recueil de norme française.
- Al-Jabre S, Al-Akloby OM, Al-Qurashi AR, Akhtar N (2005). Thymoquinone an active principle of *Nigella sativa* inhibited *Aspergillus niger*. Pak. J. Med. Res. 42(3):102-104.
- Allouche J (2003). Development of new methods for the elaboration of multiple emulsions Water / Oil / Water., Ph.D. Thesis, University of Lausanne pp. 12-18.
- Amrouche A, Benmehdi H, Moussaoui A, Mebarki K, Chaoufi A, Saneba A, Lazouni AH, Chabane SD (2011). Evaluation of antifungal activity of some oils from Algerian medicinal plants against *Aspergillus flavus* strain produced aflatoxins. J. App. Pharm. Sci. 01(08):48-53.
- Barnett HL (1972). Illustrated general of imperfect fungi. Burgess publishing company. 3rd edition Minnesota (USA).
- Bejaoui H (2005). Ochratoxinogenic fungus and ochratoxin A (OTA) in French vineyards and biological processes determining OTA in grape must. PhD thesis. National Polytechnic Institute, National School agronomy, Toulouse 1-5.
- Belsem M, Marzouk Z, Décor R, Edziri H (2009). Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian Citrullus colocynthis Schrad. From Medenine. J. Ethnopharmacol. 125:344-349.
- Benmansour k, Medjahed K, Tennouga L, Mansri A (2003). Ionic conductivity of poly[N-(3,6,9-trioxadecacyl)-4-vinylpyridinium]] salts with univalent counter-ions in aqueous solution. Polymer 39:1443-1449.
- Bock J, Valint JR, Pace SJ, Siano DB, Schulz DN, Turner, SR (1988). Water-Soluble Polymers for Petroleum Recovery. G. A. Stahl, D. N. Schulz, Plenum Press, New York 9:147.
- Bouzouitta N, kachouri F, Benhalima M, chaabouni MM (2008). Chemical composition and antioxidant, antimicrobial and insecticidal activities of essential oil of Juniperus phoenicea. J. Chem. Soc. Tunisia 10: 119-125.
- Canadas D (2006). Evaluation du procédé oxygreen pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Thèse pour l'obtention de docteur en génie des procédés environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse, France pp. 185-186.
- Codex Alimentarius (1996). Rapport de la quinziesme session du compte du codex sur les graisses et les huiles : 61
- Dale W, Raynor L, Mitchell A, Walker R, Walker K (2004). Antifungal Activities of Four Fatty Acids against Plant Pathogenic Fungi. Mycopathologia Revue 157(1):87-90.

- Doi M, Edwards SF (1986). The theory of polymer dynamics, Oxford University Press, New York.
- Duris D (2000). Coffee and Ochratoxin Contamination. Food Safety Management in Developing Countries. (CIRAD-CP). 34398 Montpellier Cedex 5. France pp. 1-5
- Flory PJ (1971). Principles of polymer chemistry, Ithaca New York cornell University press pp. 399-425
- Haris C (1989). Introduction to modern microbiology black wall scientific publication p. 179.
- Karleskind A (1992). Manual des corps gras. Edition lavoisier Tec et doc, Paris p. 1579
- Marzouk B, Marzouk Z, decor R (2009). Antibacterial and anticandidal screening of tunisian *Citrullus colocynthis* Schard. from medecine. J. Ethnopharmacol. 125:344-349.
- Ollé M (2002). Analyse des corps gras DGCCRF, Laboratoire interrégional de Montpellier France, Techniques de l'ingénieur p. 3325.
- Pitt JI (1973). An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. Mycol. 65:1135-1157.
- Regalado G, Perez-Arvizu O, Garcia-Almendarez B, Whitaker JR (1999). Purification and properties of two acid peroxidases from *Brussels sprouts*. J. Food Biochem. 23:435-450.
- Remmal A, Elaraki AT, Bouchikhi T, Rhayour K, Ettayibi M (1993). Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in Agar medium. J. Essent. Oil Res. 5:179-184.
- Schafferman D, Beharav A, Shabelsky E, Yaniv Z (1998). Evaluation of *Citrullus colocynthis* a desert plant native in Israel as a potential source of edible oil. J. Arid Environ. 40:431- 439.
- Singh P, Kumar A, Dubey NK, Gupta R (2009). Essential Oil of *Aegle marmelos* as a Safe Plant-Based Antimicrobial Against Postharvest Microbial Infestations and Aflatoxin Contamination of Food Commodities. Journal of food science. 74(6):302-307.
- Tahani N, Elamrani A (2008). Utilisation des Produits de boulangerie rassis comme aliments pour animaux: Risques et dangers. Technologies de Laboratoire 3(10):4.
- Yakhlef G, Laroui S, Hambaba L, Aberkane MC, Ayachi A (2011). Assessment of antimicrobial activity of *Thymus vulgaris* and *Laurus nobilis*, plants which are used in traditional medicine. Phytothérapie 9(4):209-218.
- Yingying X, Clifford H, Charlene WH, Frank M (2008). Fungistatic activity of flaxseed in potato dextrose agar and a fresh noodle system. Int. J. Food Microbiol. 121:262-267.
- Ziyada AK, El Hussein SA (2008). Physical and chemical characteristics of *Citrullus lanatus* Var. *Colocynthoide* Seed Oil. J. Phys. Sci. 19(2):69-75.



ISSN: 2231-3354
 Received on: 04-10-2011
 Revised on: 15-10-2011
 Accepted on: 22-10-2011

Evaluation of antifungal activity of some oils from Algerian medicinal plants against *Aspergillus flavus* strain produced aflatoxins

A. Amrouche, H. Benmehdi, A. Moussaoui, K. Mebarki, A. Chaoufi, A. Saneba, A. Lazouni .H and D. Chabane Sari

A. Amrouche, A. Saneba
 A. Moussaoui, K. Mebarki,
 A Chaoufi

Laboratory of Plant Resource
 Development and Food Security in
 Semi Arid Areas, South West of
 Algeria, BP 417, University of
 Bechar, Algeria.

A. Lazouni .H, D. Chabane Sari
 Laboratory of Natural Products
 Research (LAPRONA)
 University of Tlemcen, Algeria.

H. Benmehdi

^aLaboratory of LASNABIO,
 Department of Chemistry, University
 of Tlemcen 13000 Algeria.

^b Laboratory of Plant Resource
 Development and Food Security in
 Semi Arid Areas, South West of
 Algeria, BP 417, University of
 Bechar, Algeria.

For Correspondence

A. Amrouche
 Laboratory of Plant Resource
 Development and Food Security in
 Semi Arid Areas, South West of
 Algeria, BP 417, University of
 Bechar, Algeria.

ABSTRACT

Antifungal activity of the oils extracts of *Citrullus colocynthis* L., *Linum usitatissimum* L., *Nigella sativa* L. collected from Bechar Department in the region of (Algeria) has been evaluated in this present study. Two methods were used in this investigation: radial growth on solid medium and biomass on liquid medium. The oils extracts were obtained by Soxhlet extraction of the seeds part. The values of physicochemical indices of our oils such as acid, acidity and peroxide were also determined. The results of the antifungal potency revealed that the seeds oils exhibited different degrees of inhibition against *Aspergillus flavus* MTTC 2799. However, evaluation of radial growth on *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) solid medium showed slight mycelial growth proportional to oil concentration added to the medium. Antifungal indices investigation allowed as to put our oils in the order of effectiveness: *L. usitatissimum* (29%) > *C. colocynthis* (26.5 %) > *N. sativa* (18.75 %). Evaluation of *Aspergillus flavus* biomass production on *Potatoes Dextrose Broth* (PDB) on liquid medium revealed that the studied oils produced a variable weight reduction (*C. colocynthis* and *L. usitatissimum* at concentration superior to (80µl/ml). On the contrary, *N. sativa* oil reduced *Aspergillus flavus* biomass at concentrations of 80µl/ml and 100µl/ml.

Keywords: Antifungal activity, oils, *Citrullus colocynthis* L., *Linum usitatissimum* L., *Nigella sativa* L., *Aspergillus flavus*

INTRODUCTION

Fungi are significant destroyers of foodstuffs and grains during storage, rendering them unfit for human consumption by retarding their nutritive value and often by producing mycotoxins (Marin *et al.*, 1999; Janardhana *et al.*, 1998). A significant portion of the agricultural produce in the country and the world over become unfit for human consumption due to mycotoxins contamination of grains, especially those produced by species of *Aspergillus* (Janardhana *et al.*, 1999; Chandra R. and Sarbhoy A.K., 1997; Devi *et al.*, 2001; Lopez *et al.*, 2010; Pitt *et al.*, 2000). More than 25% of the world cereals are contaminated with known mycotoxins and more than 300 fungal metabolites are reported to be toxic to man and animals (Matheron *et al.*; 2005). Mycotoxins especially aflatoxins produced by *A. flavus* species are reported to be toxic. Besides, they are thermally stable and resistant at high pH which they make detoxication skills are not efficacy (Bourais and Amine; 2006). Unfortunately, remove completely the mycotoxins still an impossible mission. Thus, there is a need to search for alternative approaches to store

grains/cereals for human consumption without toxicity problems that are ecofriendly and not capital intensive. Plant extracts of many higher plants have been reported to exhibit antifungal properties under laboratory trails (Okigbo and Ogbonnaya, 2006; Bouamama *et al.*, 2006; Mohana and Raveesha, 2006; Ouraïni *et al.*, 2005). Plant metabolites and plant based pesticides appear to be one of the better alternatives as they are known to have minimal environmental impact and danger to consumers. This led the authors to screen *in vitro* oils extracts of *C. colocynthis*, *L. usitatissimum*, *N. sativa*. for antifungal activity against *A. flavus* specie with the ultimate aim of developing plant based formulations for plant disease management and safe storage of grains.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and extracts preparation

The *C. Colocynthis* plant used for the present study was collected in February 2010 in ain Essdar, Kenadsa area, Bechar Department, Algeria. The seeds were separated from fruits and shade dried at room temperature for 10 days. In contrast, the *L. usitatissimum* and *N. sativa* seeds were purchased from Bechar Market in the same date. The dried seeds part plants were milled to a fine powder in an electrical mill and stored in the dark at room temperature in recipients until required. The finely powdered seeds materials were extracted with organic solvent chloroform using soxhlet apparatus for 6 hours. The different extracts obtained were subsequently concentrated under reduced pressure to get their corresponding oils extracts residues (AFNOR, 1988).

Fungal material and confirmation of testing strain

The seeds oil extracts were assayed for antifungal activity against the fungal strain *A. flavus* MTTC 2799 obtained from *Arachis hypogaea* in biology laboratory at Bechar University. Confirmation of *Aspergillus* genera was realized by micro-culture method described by Harris (1989) and Barnett (1972). Furthermore, confirmation of *A.flavus* species was carried out by Single Spore method using three cultures media: Malt Extract Agar (M.E.A) at 25°C, Glycerol Nitrate Agar (G25N) at 25°C and Czapek Yeast Agar (C.Y.A) at 5°C and 37°C. Using the identification keys of Pitt and Hocking (1973), observation has been made after the first and second week. Confirmation of *A.flavus* strains was carried out by inoculation at 25°C in AFAP medium which give oranges Revers plate. This fungus was stored in tubes of PDA acidified at 4°C.

Aflatoxinogenic Test

A. flavus was sowed on Y.E.S (Yeast Extract Sucrose) medium rich on B vitamin complex. After two weeks of incubation at 30 ± 2 °C, the biomass was removed by filtration of Y.E.S. The filtrate was added then to 180 ml of chloroform and stirred for 30min. After decantation, the organic layer was concentrated to 2ml. Aflatoxins were determined in each extract by spotting samples onto thin layer chromatography plate. Plate was developed with a toluene/Ethyl acetate/ Formic acid (50:40:10, v/v/v) solvent

system. Aflatoxin standard was spotted on the same plate as reference and aflatoxin spots were identified using 365 nm UV (Asso. of off. Anal. Chem., 1975). The presence of Aflatoxins was provided by appearance of blue fluorescence for AFB which has the same R_f as control.

Determination of percent mycelial inhibition by growth radial technique on solid medium

Selected concentrations of 50 µl/ml ,100 µl/ml ,150 µl/ml ,200 µl/ml ,250 µl/ml, 275 µl/ml and 300 µl/ml of seeds oil extracts of *C. colocynthis*, *L. usitatissimum* and *N. sativa* were prepared using 5% Tween 80 and 20% Agar added then to 20 ml of PDAA solid medium. After agitation, the selected solutions were transferred into a Petri plates which were incubated for 7days at 25 ± 2°C. Mycelial radial growth was measured from the third day of incubation (Soro, 2010; Kra, 2009). The inhibition percentage of mycelial growth of each oil was calculated using the following formula ($PI_g = ((DT - D)/DT) \times 100$) where DT is mean diameter of mycelial growth in control and D is mean diameter of mycelial growth in treatment (Singh *et al.*, 2009).

Determination of percent mycelial inhibition by biomass technique on liquid medium

Evaluation of biomass liquid medium was achieved by counting of spores' number using Malassez hematimeter in order to obtain the concentration of 10⁵spores/ml (Serghat *et al.*; 2004). This technique consists to put different volumes of oil in flasks and completed them with 50 ml of PDBa (Potato Dextrose Broth acidified) in order to obtain the following concentrations: 20 µl/ml ,40 µl/ml ,60 µl/ml ,80 µl/ml ,100 µl/ml, 110 µl/ml and 120 µl/ml. These liquid cultures were sowed with 30µl of sporal suspension. The flasks were incubated for 14 days at 25 ± 2°C (Tubajika, 2006; Hibar *et al.*, 2006). After filtration, the filter paper was dried at 60°C during 24hours (Dhandhukia P.C. and Thakkar; 2007). Biomass weight formed (P) was determined using the following formula of Intiaj and Lee (2007) ($P = P_1 - P_0$) where P₀ is the filter paper weight and P₁ is the filter paper and fungal biomass weight after dryness.

RESULTS

Extraction carried out on seeds part plants has given the following yields of oils of *L.usitatissimum* (39.96%), *N.sativa* (33.71%) and *C.colocynthis* (17.63%). In order to determine the quality of our oils, physico-chemical indices were measured and illustrated in table 1. On the other hand, our results obtained by identification methods provided that our strain corresponded well to *A. flavus* group. Besides, as seen in figure 1, aflatoxinogenic test revealed that our strain produced AFB1 (blue fluorescence).

The antifungal activity of oils extracts was tested to prevent the mycelial growth of *A.flavus* fungal organism that is harmful to human beings. Different concentrations of oils of seeds tested (Figure 2). Oil extract of *L.usitatissimum* significantly arrested the mycelial growth of *Aspergillus flavus* MTTC 2799 and showed moderate effect on sporulation (figure 2A). Figure 2B

Table 1. Physico-chemical results analysis.

	<i>C. colocynthis</i> oil	<i>L. usitatissimum</i> oil	<i>N. sativa</i> oil
Refraction indice	1.4754	1.4595	1.4700
Relative density	0.895	0.987	1.030
Acid indice (KOH/g)	5.3	1.59	52.9
Acidity (%)	2.66	0.80	26.58
Peroxide indice (meq. O ₂ /kg)	7.35	5.68	30.01

shows the activity of oil residue of *C. colocynthis* with complete sporulation and means efficacies on mycelial growth of *A.flavus*. In contrast, *N.sativa* oil appears more efficacies on sporulation and shows less inhibition on mycelial growth of *A.flavus* (Figure 2C).

As shown in figure 3, the results of biomass technique on liquid medium revealed that the biomass weight formed under action of our oils were variable and superior to controls. Results analysis of fungal biomass produced by different concentrations of *L.usitatissimum* oil showed that the biomass weight (0.2190g and 1.1530 g) were more or less superior to controls (0.2584 g) (Figure 3A). Whereas, biomass weights at concentrations of 20, 40 and 60 µl/m were proportional to concentration of oil added in the medium. In contrast, biomass formed under effect of the rest concentrations were inversely proportional. Same results were obtained for *C. colocynthis* oil (figure 3B). As given in Figure 3(C), we observed a fluctuation in mean biomass weight under action of the different concentrations of *N. sativa* oil. So, at concentrations of 20, 40, and 60 µl/ml the weights are nearly constant (0.6400g), then decrease in concentrations of 80 and 100µl/ml (0.5047 g - 0.3390 g). We observed also, elevation of biomass weight by increase of the oil concentrations (110 and 120 µl/ml) where the weight value was found to be 0.6000 g.

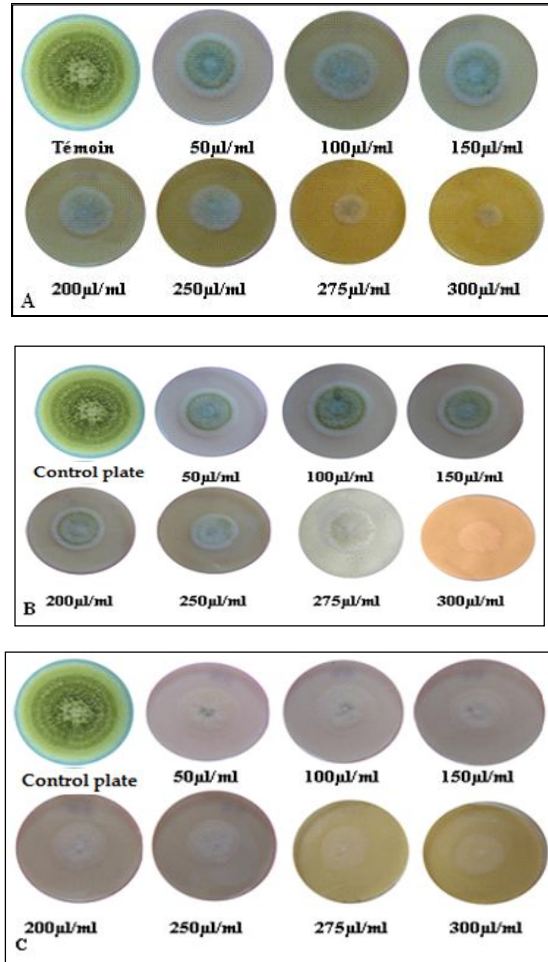


Fig 2. Specimens of radial growth strain under effect of different concentrations of oils: *L. usitatissimum* (A); *C. colocynthis* (B) and *N. sativa* (C).

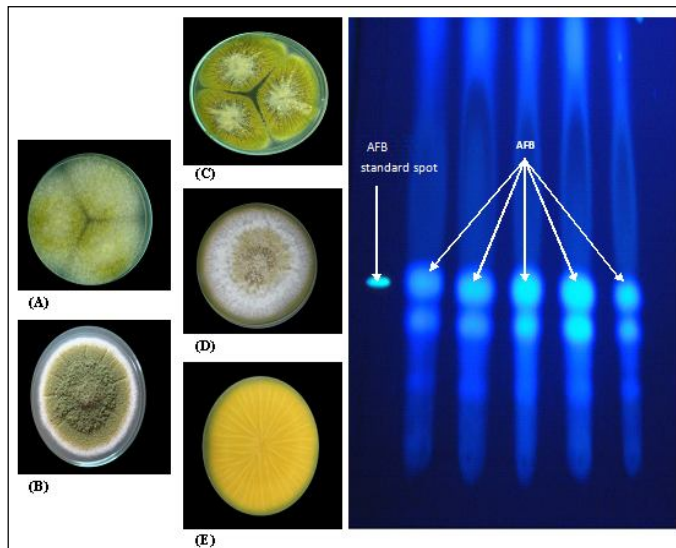
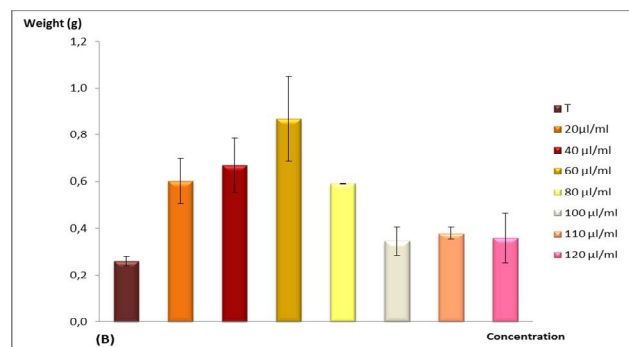
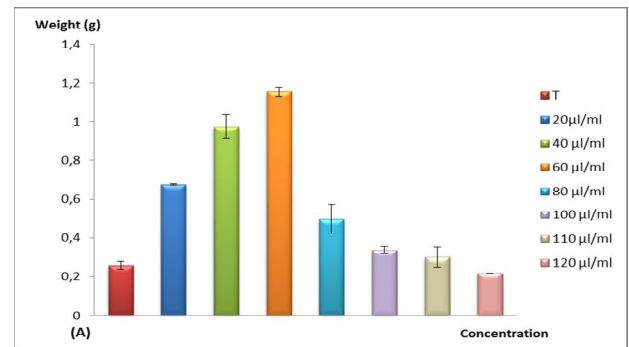


Fig 1. *A. flavus* strain by « Single Spore » method: A: G25N at 25°C; B: MEA medium at 25°C ; C : CYA medium at 37°C; D : AFAP medium at 25°C ; E: AFAP revers strain and TLC of aflatoxinogenic test.



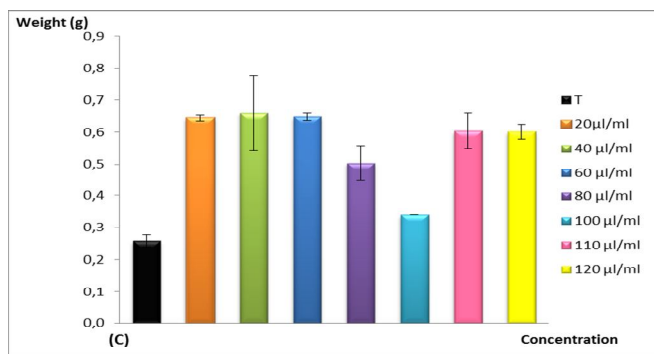


Fig 3. Biomass weight formed in the presence of different concentrations of oils: *L. usitatissimum* (A); *C. colocyntis* (B) and *N. sativa* (C)

DISCUSSION

Aflatoxins are the most notorious of the mycotoxins causing acute and chronic toxicoses in foodstuff (CAST, 2003). *A. flavus* is one of the species of *Aspergillus* that produce aflatoxins. This fungus can grow on a wide range of agricultural commodities. Aflatoxins can be produced in preharvest as well as in stored products as cereals (Wilson and Payne; 1994). Plant-produced compounds are becoming of interest as a source of safer and more effective substances than synthetically produced antimicrobial agents. Many oils obtained from plant parts have been reported as effective inhibitors of fungal growth and aflatoxin production and have also been shown to contain antitoxigenic properties (Bhatnagar and McCormick, 1988; Ansari and Shrivastava, 1991). The present study was undertaken in order to observe the effect of various concentrations of seeds oils of *C. colocyntis* L., *L. usitatissimum* L. and *N. sativa* L on the growth of *A. flavus* and aflatoxin production.

In the first experiment for determination of oils extraction yields, the values varied between 17 and 39%. For *N. sativa* oil, the result of extraction has found to be 33.71% which is in agreement with findings of Meral *et al.* (2004), AL-Beitawi *et al.* (2009), and Rouhou-Cheikh *et al.* (2007) who reported similar oil yield varying between 33.71% and 40.35%. This variation of weight residue may be due to collect period, environment conditions, soil, extraction and storage conditions. For *C. colocyntis*, the yield of extraction oil was found to be (17.63%) which is supported by some reports of Sebbagh *et al.* (2009), Abu naser and Potts (1953) and Schafferman *et al.* (1998). In addition, from *L. usitatissimum*, yield of 39.90% of oil was obtained from seeds part plant. This value corresponded well to Quebec research Center (35 to 45 %) and Diedrichsen findings (26 to 45%).

In the second experiment, the analytical control of oils was based on determination of chemical indices (peroxide, acid and acidity). The values of peroxide indice of *C. colocyntis* (7.35 meq. of O₂/kg) and *L. usitatissimum* (5.68 meq. of O₂/kg) are in agreement with codex normes (inferior to 10 meq. of O₂/kg of oil). These results confirm that our oils are not oxidized, in contrast to *N. sativa* with high value of peroxide indice (30.01 meq. of O₂/kg). This oxidation may be due to extraction and storage conditions that produced oxidation reaction of unsaturated fatty acids, carotenoids

or vitamins A and B (Ghedira, 2006; Appelbaum *et al.*, 1989). For acid indice, the data showed that *L. usitatissimum* has as value 1.59 mg KOH/g conformed to codex normes (4 mg KOH/g). It is to note that *C. colocyntis* presented a slight elevation (5.3 mg KOH/g) compared to codex normes. However, Akpambang and Amoo (2008) reported that *C. colocyntis* oil obtained from Nigerian country has as acid indice value 8.02 ± 0.07 mg KOH/g. From our findings, we observed well that *N. sativa* oil presented high value which may be attributable to free fatty acids high present in the seeds. In contrast to our study, Tauseef (2009) showed that *N. sativa* oil possess indice acid value of 0.34 mg KOH/g inferior to our oil (52.9 mg KOH/g). In addition to these indices, other parameters such as refraction indice and relative density were also determined. As seen in table 1, our results of refraction indice (1.4595, 1.4700 and 1.4754 respectively for *L. usitatissimum*, *N. sativa* and *C. colocyntis*) are nearly similar to codex norms (1.4677-1.4707) and Akpambang report. Furthermore, the relative density values of *C. colocyntis* reported by Akpambang *et al.* (2008) (1.51 ± 0.02) is higher than our oil 0.8950. Besides, Tauseef (2009) demonstrated that *N. sativa* presented relative density of 0.923 ± 0.001 inferior to our obtained data (1.0300).

In the third experiment, and in order to complete the previous works on antimicrobial plants, we have attempted to evaluate antifungal potency of seeds oils of *N. sativa*, *L. usitatissimum* and *C. colocyntis* against *A. Flavus* strain by growth radial on solid medium and biomass evaluation on liquid medium. The preliminary results of growth radial technique revealed that all the oils tested exhibited different degrees of antifungal activity against *Aspergillus flavus*. The percent of inhibition of *L. usitatissimum* was found to be 29% compared to *C. colocyntis* (26.5%) and *N. sativa* (18.75%). Yingying *et al.* (2008) reported about the antifungal activity of seeds oil of *L. usitatissimum* (seeds powder at 6% concentration inhibit completely (100%) the development of *A. flavus*). The present study confirms this investigation where activity may be due to fatty acids more frequent in the seeds especially linoleic acid (Schafferman *et al.*, 1998; Dale *et al.*, 2004). For *C. colocyntis*, Belsem *et al.* (2009) reported the antifungal activity of the fruits parts. Moreover, Schafferman *et al.* (1998) suggested that the reduction of the growth strain may be correlated to linoleic acid more present in *C. colocyntis* seeds oil.

For *N. sativa*, numerous works have been made to provide the antifungal activity of this plant against various strains. Agrawal *et al.* (1979) found that oil extract has been proved to possess excellent activity against *A. niger*, besides Nazrul *et al.* (1989) confirmed the studied effect of *N. sativa* seeds on *A. flavus* strain. Furthermore, Singh *et al.* (2005) showed that 6 µl/ml of oil concentration exhibited inhibition activity with 73.3%. Thymoquinone was believed to be the responsible constituent to this effect. This assumption was confirmed by Al-Jabre *et al.* (2005) who reported that thymoquinone at concentration of 2 mg/ml after one week of incubation has antifungal activity via inhibition of 100% against *A. niger* strain.

Results obtained from biomass weight on liquid medium showed different fungal weights which are superior to controls. These data may be due to inoculum quantity added on culture medium or strain using oil as carbon source. Comparing biomass weight to selected concentrations, *Lusitatissimum* and *C.colocynthis* oils reduced biomass weights at concentration of 80µl/ml. This reduction effect may be due to linolenic and linoleic acids abundant in these oils. This assumption has been confirmed by Dale *et al.* (2004) report (reduction of biomass weight at 100 µl/ml concentration).

Finally, for *N.sativa*, fluctuation of biomass weights was observed beginning by diminution at 80µl and 100 µl/ml concentrations of oil. Same observations have been reported by Al-Jabre *et al.* (2005) and Akhtar *et al.* (2007) who suggested that biomass variation is believed to be due to thymoquinone.

CONCLUSION

The oil extracts of the plants part used showed prominent antifungal activity against *A. flavus*. This potency may be attributable to fatty acids especially linoleic and linolenic acids or synergic effect of their constituents. Further investigations on their mechanisms will be able to provide a great potential for the control of AFB production.

REFERENCES

- Abu naser A.M., Potts W.M.. The Analysis and Characterization of the Oil from the Seed of *Citrullus colocynthis*. The journal of the American oil chemists society 1953; 118-120.
- Agrawal R., Kharya M.D, Shrivastava R. Antimicrobial and anthelmintic activities of the essential oil of *Nigella sativa* Linn. Indian J Exp Biol. 1979; 17: 1264-1265.
- Akhtar N., Alakloby O.M., Aljabre. S.H., Alqurashi A.R., Randhawa M.A.. Comparison of Antifungal Activity of Thymoquinone and Amphotericin B Against *Fusarium solani* in-vitro. Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences) 2007; 8. (2): 173-145.
- Akpambang V., Amoo I.A., Izuagie A.A.. Comparative compositional analysis on two varieties of melon (*Colocynthis Citrullus* and *Cucumeropsis edulis*) and a variety of almond (*Prunus amygdalus*). Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 2008; 4 (6): 639-642.
- AL-Beitawi N.A., EL-Ghousein S.S., Nofal A.H. Replacing bacitracin methylene disalicylate by crushed *Nigella sativa* seeds in broiler rations and its effects on growth, blood constituents and immunity. Livestock Science 2009; 125: 304-307.
- AFNOR. Corps gras, grains oléagineuses, produits dérivés, Recueil de norme française 1988.
- Al-Jabre S., Al-Akloby O-M., Al-Qurashi A-R., Akhtar N. Thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa*, inhibited *Aspergillus niger*. Pakistan Journal of Medical Research 2005; 42 (3): 102-104
- Ansari A.A. and Shrivastava A.K. The effect of eucalyptus oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. Lett.App.Microbiol. 1991; 13: 75-77.
- Appelbaum M., Forrat C., Nillus P. Abrégé de diététique et de nutrition 2nd édition Masson Paris (1989) 473.
- Association of Official Analytic Chemists. Natural poisons 26. Official methods of analysis. Association of Official Analytic Chemists, Washington, D.C. (1975) 24
- Barnett H.L. Illustrated general of imperfection fungi. Burgess publishing company. 3rd edition Minnesota (USA) (1972).
- Belsem M., Marzouk Z., Décor R., Edziri H. Antibacterial and anticandidal screening of Tunisian *Citrullus colocynthis* Schrad. from Medenine. Journal of Ethnopharmacology 2009; 125: 344-349.
- Bhatnagar D. and McCormick S.P. The inhibitory effect of neem (*Azadirachta indica*) leaf extracts on aflatoxin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. J.Ass.Off.Chem.Soc. 1988; 65, : 1166-1168.
- Bouamama H., Noel T., Villard J., Benharref A. and Jana M. Antimicrobial activities of the leaf extracts of two Moroccan *Cistus* L. species. Journal of Ethnopharmacology 2006; 104: 104-107.
- Bourais I., Amine A. Aflatoxines toxiques redoutables dans nos aliments. Revue. Les technologies de laboratoire 2006 ; 4-8.
- CAST. Mycotoxins: Risks in plant, animal, and human systems. Council for Agricultural Science and Technology, Ames, IA (2003). Available from <http://www.cast-science.org/cast/pub/Mycotoxins.pdf>.
- Chandra R. and Sarbhoy A.K. Production of Aflatoxins and Zearalenone by the toxigenic fungal isolates obtained from stored food grains of commercial crops. Indian Phytopathology 1997; 50: 458-68.
- Dale W., Raynor L., Mitchell A., Walker R., Walker K. Antifungal Activities of Four Fatty Acids against Plant Pathogenic Fungi. Mycopathologia revue 2004; 157 (1): 87-90.
- Devi K.T., Mayo M.A., Reddy G., Emmanuel K.E., Larondelle Y. and Reddy D.V.R.. Occurrence of Ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. Food Additives Contamination 2001; 18: 830-835.
- Dhandhukia P.C., Thakkar V.R.. Standardization of growth and fermentation criteria of *Lasiodiplodia theobromae* for production of jasmonic Acid. African Journal of Biotechnology 2007; 6 (6) : 707-712.
- Ghedira K. La nigelle cultivée : *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae). Laboratoire de pharmacognosie, faculté de pharmacie de Monastir, Tunisie. Phytothérapie 2006 ; 5:220-226.
- Haris C. Introduction to modern microbiology black wall scientific publication 1989; 179.
- Hibar K., Daami-Remadi M., Jabnoun-Khiareddine H., Znaïdi I.E., El Mahjoub M. Effet des extraits de compost sur la croissance mycélienne et l'agressivité du *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicislycopersici*. Biotechnol. Agron. Soc. Environ. 2006; 10 (2): 101-108.
- Imtiaj A., Lee T.S. Screening of antibacterial and antifungal activities from Korean wild mushrooms. World journal of agricultural sciences 2007; 3 (3): 316-321.
- Janardhana G.R., Raveesha K.A. and Shetty H.S. Modified atmosphere storage to prevent mould-induced nutritional loss in maize. Journal of Science Food and Agriculture 1998; 76: 573-578.
- Janardhana G.R., Raveesha K.A. and Shetty H.S. Mycotoxin contamination of maize grains grown in Karnataka (India). Food Chemical Toxicology 1999; 37: 863-868.
- Kra K.D., Diallo H.A., Kouadio Y. J.. Activités antifongiques de l'extrait de *Chromolaena odorata* (L.) King & Robins sur deux isolats de *Fusarium oxysporum* (E.F. Sm.) responsables du jaunissement mortel des feuilles des bananiers. Journal of Applied Biosciences 2009; 24 : 1488-1496.
- Lopez Grio S.J., Frenich A.G., Martinez Vidal J.L., Romero-Gonzalez R.. Determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2 and Ochratoxine A in animal feed by ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Sep. Sci. 2010 ; 33 : 502-508.
- Marin. S., Homedes V., Sanchis V., Ramos A.J. and Magan N.. Impact of *Fusarium moniliforme* and *F. proliferatum* colonisation of maize on calorific losses and fumonisin production under different environmental conditions. Journal of Stored Product Research 1999; 35: 15-26.
- Matheron G., Amsallem I., Puygrenier M., Abecassis J. Étudier les contaminants chimiques ou microbiens des aliments. Alimentation, Nutrition, Santé 2005; 2 : 18-21.
- Meral I., Donmez N., Baydas B., Belge F., Kanter M. Effect of *Nigella sativa* L. on heart rate and some haematological values of alloxan-induced diabetic rabbits. Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science 2004; 31 (1): 49-53.
- Mohana D.C. and Raveesha K.A. Anti-bacterial activity of *Caesalpinia coriaria* (Jacq.) Willd. against plant pathogenic *Xanthomonas*

pathovars: an eco-friendly approach. *Journal of Agricultural Technology* 2006; 2: 317-327.

Nazrul I., Ahsan M., Choudhury M. H., Abdul malek M.. Antifungal activities of the oils of *Nigella sativa* seeds. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* 1989; 2(1): 25-28.

Okigbo R.N. and Ogbonnaya U.O. Antifungal effects of two tropical plant leaf extracts (*Ocimum gratissimum* and *Aframomum melegueta*) on post harvest yam (*Dioscorea* spp.) rot. *African Journal of Biotechnology* 2006; 5: 727-731.

Ouraïni D., Agoumi A., Ismaïli-Alaoui M., Alaoui K. Étude de l'activité des huiles essentielles de plantes aromatiques à propriétés antifongiques sur les différentes étapes du développement des dermatophytes. *Phytothérapie* 2005; 4: 147-157.

Pitt J.I., Basilio J.C., Abaraca M.L., Lopez C. Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology* 2000; 38 (1): 41-46.

Pitt J.I. An appraisal of identification methods for *Penicillium* species. Novel taxonomic criteria based on temperature and water relations. *Mycology* 1973; 65: 1135-1157.

Rouhou-Cheikh S., Besbes S., Hentati B., Blecker C. *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction. *Food Chemistry* 2007; 101: 673-681.

Schafferman D., Beharav A., Shabelsky E., Yaniv Z.. Evaluation of *Citrullus colocynthis*, a desert plant native in Israel, as a potential source of edible oil. *Journal of Arid Environments* 1998; 40: 431-439.

Sebbagh N., Cruciani-Guglielmacci C., Ouali F., Sari C. Comparative effects of *Citrullus colocynthis*, sunflower and olive oil-enriched diet in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Algeria. Diabetes & Metabolism* 2009; 35: 178-184

Serghat S., A. Mouria A., Ouazzani touhami A., Badoc A., Douira A.. Effet de quelques fongicides sur le développement in vitro de

pyricularia grisea et *helminthosporium oryzae*. *Bull. Soc. Pharm.* 2004; 143: 7-18.

Singh P., Kumar A., Dubey N.K., Gupta R.. Essential Oil of *Aegle marmelos* as a Safe Plant-Based Antimicrobial Against Postharvest Microbial Infestations and Aflatoxin Contamination of Food Commodities. *Journal of food science* 2009; 74 (6): 302-307.

Singh G., Marimuthu P., Heluani C., Catalan C. Chemical constituents and antimicrobial and antioxidant potentials of essential oil and acetone extract of *Nigella sativa* seeds. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 2005; 85: 2297-2306.

Soro S., Ouattara D., Guédé N.Z., Coffi K. Effet Inhibiteur in Vitro et in Vivo de l'extrait de Poudre et de l'huile Essentielle de *Xylopia Aethiopica* (Dunal) A. Rich. (Annonaceae) sur *Fusarium oxysporum* f. sp *Radicis-lycopersici* (Forl), Champignon Parasite des Cultures de Tomate. *European Journal of Scientific Research* 2010 ; 39(2): .279-288.

Tauseef M. Characterization of black cumin seed oil and exploring its role as a functional food. Thèse de doctorat. Inédite, national institute of food science and Technology University of agriculture. Faisalabad (2009).

Tubajika K.M. Efficacy of alkyl dimethyl benzyl ammonium chlorid on supression of *physalospora vaccinii* in laboratory assays. *Journal of food protection* 2006; 69 (10): 2460-2464.

Wilson D.M. and Payne G.A. Factors affecting *Aspergillus flavus* group infection and aflatoxin contamination of crops. In the toxicology of aflatoxins. *Human Health, Veterinary, and agricultural significance* (David L. Eaton and John D. Groopman, San Diego: Academic Press, (1994).

Yingying X., Clifford H., Charlene W.H., Frank M. Fungistatic activity of flaxseed in potato dextrose agar and a fresh noodle system. *International Journal of Food Microbiology* 2008; 121: 262-267.

ملخص

تهتم هذه الدراسة العلمية بالتقييم المخبري للمفعول المضاد للسموم الفطرية لدى الزيوت والأسترات الميثيلية للأحماض الدسمة المستخلصة من ثلاث نباتات طبية من منطقة بشار ألا وهي بذور الكتان " لينيو ماوزيتاتيسيموم" بذور الحبة السوداء "نجيلا ساتيفا", وبذور الحنظل " سبتريلوس كولو كنتنس" وذلك بهدف تثبيط فطري الأسبرجلوس فلافوس و الأسبرجلوس اوكراسيوس المنتجين للسموم. خلال هذه الدراسة , استعملنا طريقتين : النمو العرضي على الوسط المغذي الصلب و تقيم الكتل الحيوية في الوسط المغذي السائل. كما قمنا بإجراء اختبار حيوي لمعرفة تأثير تثبيط هذه الزيوت على فأر ويسطار طور النمو تمت تغذيته سابقا بوجبات ملوثة بكمية من السموم الفطرية : 125 ميكروغرام/غرام AFB₁ أو/و 250 ميكروغرام/ غ OTA

أثبتت الدراسة أن البذور المدروسة ذات مردودية عالية من الزيوت والأسترات وقد أظهرت التقنيات التحليلية الفيزيوكيميائية (خاصية اللزوجة والتحاليل الطيفية) ثراء الزيوت , الأسترات الميثيلية بحمض لينوليك و حمض لينولينيك. كما أظهر تقييم المفعول المضاد للفطريات أن هذه الزيوت وأسراتها ساهمت بشكل كبير في تأخير نمو الفطريات المدروسة. كان هذا الأخير بنسبة كبيرة في الوسط المغذي الصلب و أكثر فعالية على نمو الأسبرجلوس فلافوس بالمقارنة مع الأسبرجلوس او كراسيوس. أثبتت الدراسة أن الزيت المشتقة من بذور الكتان لينوم اوزيتاتيسوم وأسراتها أظهرت مؤشرات مضادة للفطريات اعلى من الزيوت الأخرى IAF_{HL}=55.65% للأسبرجلوس فلافوس IAF_{HL}=42.46% للأسبرجلوس او كراسيوس IAF_{EML}=42.46% للأسبرجلوس او كراسيوس IAF_{EML}=52.04% للأسبرجلوس فلافوس. كما أن دراسة المفعول المضاد للفطريات للزيوت الثلاثة مجتمعة أظهرت دعما لتثبيط النمو الفطري.

إن الدراسة الحيوية للمفعول المعدل للزيوت المشتقة من النباتات الصلبة المذكورة أظهرت أن هذه الزيوت تتمتع بخواص مثبتة و معدلة للوزن , للأبيض الدهني و البروتين بالإضافة إلى الترانساميناز هذه التأثيرات عبارة عن دلائل توحى بالتحكم في مفعول السموم الفطرية.

على ضوء ما سبق يمكننا القول ان مفعول الزيوت والأسترات المستخلصة من هذه النباتات الطبية قد يكون حلا بديلا , فعالا و خاليا من الأعراض الجانبية, في ميدان محاربة السموم الفطرية بغرض الحفاظ على الصحة العمومية.

الكلمات المفتاحية: زيوت, استرات ميثيلية, النشاط المضاد للفطريات , اسرجيلوس ;سموم فطرية, فأر ويسطار

Abstract

This study aimed to evaluate *in vitro* the antifungal activity of oils and their fatty acids methyl esters (FAMES) isolated from three medicinal plants growing in Bechar department (*Citrullus colocynthis* L., *Linum usitatissimum* L. and *Nigella sativa* L.) against mycotoxins *A. flavus* and *A. ochraceus*. Two methods were used in this investigation: radial growth on solid medium and the evaluation of the biomass on liquid medium. It seems also necessary in this study to test *in vivo* the stabilizing or corrective impact of the oil on growing Wistar rat contaminated by 125µg / g AFB₁ and / or 250µg / OTA

The extraction of the oils from the studied plants offered acceptable yields. The characterization of the oils as well as their fatty acids methyl esters (FAMES) via spectral analysis and viscosimetric study revealed that these later are rich in α-linolenic and linoleic acids.

The results of the antifungal evaluation showed that oils and their FAMES induced underdevelopment of the studied fungi. This later was more important on the solid medium and very marked on *A. flavus* than *A. ochraceus*. The oil of *Linum usitatissimum* and its FAMES showed the best antifungal percentage (IAF HL 55.65 % *A. flavus*-IAF HL 42.46 % *A. ochraceus*), (IAF HL 52.04 % *A. flavus*-IAF HL 42.46 % *A. ochraceus*). The synergistic antifungal essay combining the three oils revealed an improvement of the inhibition of the fungal growth.

In vivo study of the regulating power of oil extracted from *Citrullus colocynthis* L. and *Nigella sativa* L. showed stabilizing and corrective effects on physical weight, lipid and protein metabolism as well as on transaminases expression. These effects behave signs for a possible modulation of the impact of these mycotoxins.

In conclusion, these fractions can therefore be a cheap, effective and non-toxic alternative, for the antimicrobial as well as the clinical fields.

Keywords: oils, Fatty acids methyl esters, antifungal activity, mycotoxins, Wistar rat

Résumé

Le but de cette étude était d'évaluer *in vitro* l'activité antifongique des huiles et de leurs esters méthyliques d'acides gras tous isolées à partir de trois plantes médicinales de la région de Bechar : *Citrullus colocynthis* L., *Linum usitatissimum* L. et *Nigella sativa* L., en vue d'inhiber une flore fongique productrice de mycotoxines *A. flavus* et *A. ochraceus*. Deux méthodes ont été utilisées dans cette enquête : la croissance radiale sur milieu solide et l'évaluation de la biomasse sur milieu liquide. On a aussi testé *in vivo* l'impact stabilisateur voir correcteur des huiles chez le rat wistar en croissance contaminé par 125µg/g AFB₁ et/ ou 250µg/g OTA.

Les graines étudiées ont fournies des rendements acceptables en huiles et en esters. La caractérisation de ces huiles ainsi que leurs esters méthyliques d'acides gras au moyen de techniques analytiques (étude viscosimétrique et spectrales) a démontré la richesse de ces huiles en acide α-linolénique et linoléique.

Les résultats de l'évaluation antifongique ont montrés que les huiles et leurs esters correspondants ont exercées un retard de croissance sur les champignons étudiés. Ce retard a été plus important sur le milieu solide et très marqué sur *A. flavus* qu'*A. ochraceus*. L'huile de *Linum usitatissimum* et ses esters concordants ont affichées les meilleurs indices antifongiques (IAF_{HL} =55.65% *A. flavus* - IAF_{HL} =42.46% *A. ochraceus*), (IAF_{EML} =52.04% *A. flavus* - IAF_{EML} =42.46% *A. ochraceus*). L'essai antifongique synergique combinant les trois huiles a révélé une amélioration de l'inhibition de la croissance fongique.

L'étude *in vivo* du pouvoir régulateur des huiles extraites des plantes médicinales (*Citrullus colocynthis* L. et de *Nigella sativa* L.) a montré que ces huiles sont dotées d'effets stabilisateurs voir correcteur sur le poids corporel, le métabolisme lipidique et protéique ainsi que l'expression des transaminases. Ces actions sont des signes révélateurs d'une éventuelle modulation de l'impact des mycotoxines.

En conclusion, ces fractions peuvent donc constituer une alternative bon marché, efficace, avide de toxicité pour le domaine de lutte antimicrobienne ainsi que le domaine clinique.

Mots clés : Huiles, esters méthyliques, activité antifongique, *Aspergillus*, mycotoxines, Rat wistar.

